

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

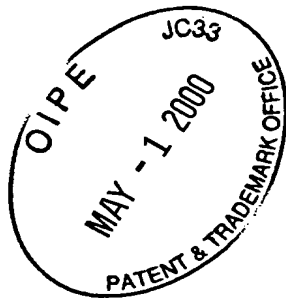
1998年 6月19日

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第189944号

出 願 人
Applicant (s):

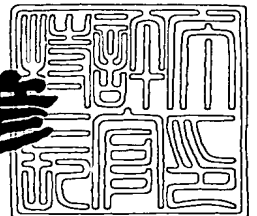
株式会社中外分子医学研究所



2000年 3月10日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3012590

【書類名】 特許願

【整理番号】 C2-905DP1

【提出日】 平成10年 6月19日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/12

【発明の名称】 P D Z ドメイン配列を有するタンパク質

【請求項の数】 16

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

【氏名】 舟橋 真一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

【氏名】 宮田 昌二

【特許出願人】

【識別番号】 596102791

【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所

【代表者】 大杉 義征

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成 9年特許願第230356号

【出願日】 平成 9年 8月12日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9716403

【書類名】 明細書

【発明の名称】 PDZドメイン配列を有するタンパク質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：1 または 2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項 2】 配列番号：1 または 2 に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、および／もしくは付加したアミノ酸配列からなり、PDZドメインに特徴的な他のタンパク質との親和性を有するタンパク質。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 に記載のタンパク質と、少なくとも 1 つの抗体認識部位を含むタンパク質もしくはペプチド、からなる融合タンパク質。

【請求項 4】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質をコードする DNA。

【請求項 5】 配列番号：2 に記載の塩基配列からなる DNA もしくはその一部に対するアンチセンス DNA。

【請求項 6】 請求項 4 に記載の DNA を含むベクター。

【請求項 7】 請求項 4 に記載の DNA を発現可能に保持する形質転換体。

【請求項 8】 請求項 7 に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質の生産方法。

【請求項 9】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質に被検タンパク質を接触させ、これらタンパク質に結合するタンパク質を選択する工程を含む、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質に結合するタンパク質のスクリーニング方法。

【請求項 10】 請求項 1 または 2 に記載のタンパク質に被検遺伝子の遺伝子産物を接触させ、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質に結合する遺伝子産物に対応する遺伝子を選択する工程を含む、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質に結合するタンパク質をコードする遺伝子のスクリーニング方法。

【請求項 11】 請求項 1 または 2 に記載のタンパク質に結合するタンパク質。

【請求項 12】 請求項 9 に記載の方法により単離しうる、請求項 11 に記

載のタンパク質。

【請求項 13】 請求項 1 または 2 に記載のタンパク質に結合するタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 14】 請求項 10 に記載の方法により単離しうる、請求項 13 に記載の遺伝子。

【請求項 15】 請求項 1 または 2 に記載のタンパク質に結合する抗体。

【請求項 16】 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質に結合する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、PDZドメイン配列を有する新規なタンパク質およびその遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】

PDZドメインを有するタンパク質としては、これまでPSD-95、hDlg、ZO-1、p55、Dsh、LIN-7、InaD、PTPL1/FAP1などが知られており、これらはPDZファミリーなどと呼ばれている。最初、95KDa後シナプス膜タンパク質 (post-synaptic density protein) PSD-95において、保存された「Gly-Leu-Gly-Phe(GLGF)」の4アミノ酸のモチーフを含む約80乃至90アミノ酸からなる3回の繰り返し構造が存在することが同定された(Neuron 9, 929-942 (1992))。その後、このドメイン構造がショウジョウバエの致死(1)ディスク ラージ-1 癌抑制タンパク質DlgA (Drosophila lethal(1) discs large-1 tumor suppressor protein DlgA) (Cell 66, 451-464 (1991))、密着結合タンパク質ZO-1 (tight junction protein ZO-1) (J. Cell Biol. 121, 491-502 (1993))のタンパク質にも見い出され、この繰り返し配列は、PSD95、DlgA、ZO-1の頭文字をとって「PDZドメイン」と名付けられた (GLGFリピートやDHR (DlgA homology region) ドメインとも呼ばれる)。PDZドメインを有するタンパク質は、このPDZドメインの配列を介して他のタンパク質と結合することが知られており、例えば、PSD-95タンパク質はNMDA受容体2B(Korna

u, H.-C., et al. (1995) Science 269, 1737-1740)、シェーカー型カリウムイオンチャンネル (Shaker-type K^+ channel) (Kim, E. et al. (1995) Nature 378, 85-88)と結合することが知られている。hDlgタンパク質は家族性大腸腺腫症遺伝子/APC (adenomatous polyposis coli tumor suppressor gene/APC) のコードするタンパク質と (Matsumine et al. (1996) Science 272, 1020-1023)、Dshタンパク質はNotchタンパク質と (Axelrod, J.D., et al. (1996) Science 271, 1826-1832)、直接結合することが報告されている。また、InaDタンパク質はショウジョウバエの視覚シグナル伝達カスケード (Drosophila visual signal transduction cascade) で機能している Ca^{2+} チャンネルタンパク質である TRP と結合することが報告されている (Shieh, B-H. and Zhu, M. Y. (1996) Neuron 16, 991-998)。PDZドメインを有するタンパク質の構造としては、このドメインを1つ有するタンパク質 (p55、Dsh)、2つ有するもの (SIP-1: J. Yanagisawa et al. J. Biol. Chem. 272, 7167-7172 (1997))、3つ有するもの (PSD-95、hDlg)、5つ有するもの (InaD、PTPL1/FAP1)、7つ有するもの (GRIP: H. Dong et al. (1997) Nature 386, 279-284)、13有するもの (Christoph Ullmer et al. (1998) FEBS Letters 424, 63-68) などがあり、多様である。また、最近マウスにおいてタンパク質中のN末端側のペプチドをコードする領域が欠落した遺伝子で、この不完全な遺伝子領域において4つPDZドメインを有するペプチドをコードする遺伝子が報告された (GeneBank 1997年5月18日登録, Accession number AF000168)。PDZドメインを有するタンパク質群は、いくつかの例外はあるが、共通して、C末に存在する「Thr/Ser-Xaa-Val」(Xaaは任意のアミノ酸残基) に代表される3アミノ酸からなる疎水性アミノ酸の領域を持った他のタンパク質と結合していることが知られている。それらのタンパク質の多くは膜貫通型のタンパク質であり、細胞内でのシグナル伝達の機能を果たしていることが予想される (TIBS 21, 455-458 (1996)、J. Yanagisawa et al. (1997) J. Biol. Chem. 272, 7167-7172)。

【0003】

このようにPDZドメインを有するタンパク質やこれと相互作用するタンパク質は、神経伝達系、アポトーシス、癌化などに関与しているため、医薬品開発の標的として近年注目を集めている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、PDZドメイン配列を有する新規なタンパク質、および該タンパク質をコードするDNAを提供することを課題する。また、本発明は、該DNAを含むベクター、該DNAを発現可能に保持する形質転換体、および該形質転換体を利用した組み換えタンパク質の製造方法を提供することを課題とする。さらに、本発明は、該DNAに対するアンチセンスDNA、該タンパク質に結合する抗体を提供することを課題とする。さらに、本発明は、該タンパク質に結合するタンパク質のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、ヒト臍帯血管内皮細胞のTNF α による遺伝子発現の変化を解析していく過程において、TNF α の刺激により発現が上昇した遺伝子を単離し、該遺伝子をプローブとしてスクリーニングを行ったところ、新規なタンパク質をコードする遺伝子を単離するに至った。本発明者等は単離した遺伝子がコードするタンパク質の構造につき解析を行ったところ、該タンパク質が、神経伝達系、アポトーシス、癌化などに関与している他のタンパク質との相互作用に重要な役割を果たしているPDZドメイン配列をその分子内に有していることを見出した。

【0006】

また、本発明者らは、単離した遺伝子を発現ベクターに組み込み、これを大腸菌に導入して培養することにより、該遺伝子がコードするタンパク質を組み換えタンパク質として調製することに成功した。さらに、調製したタンパク質をウサギに免疫することにより該タンパク質に結合する抗体を調製することに成功した。

【0007】

本発明は、分子内にPDZドメイン配列を有する新規なタンパク質およびその遺伝子に関し、より具体的には、

- (1) 配列番号：1または2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、
- (2) 配列番号：1または2に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数の

アミノ酸が置換、欠失、および／もしくは付加したアミノ酸配列からなり、PDZドメインに特徴的な他のタンパク質との親和性を有するタンパク質、

(3) (1) または (2) に記載のタンパク質と、少なくとも1つの抗体認識部位を含むタンパク質もしくはペプチド、からなる融合タンパク質、

(4) (1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA、

(5) 配列番号：2 に記載の塩基配列からなるDNAもしくはその一部に対するアンチセンスDNA、

(6) (4) に記載のDNAを含むベクター、

(7) (4) に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体、

(8) (7) に記載の形質転換体を培養する工程を含む、(1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質の生産方法、

(9) (1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質に被検タンパク質を接触させ、これらタンパク質に結合するタンパク質を選択する工程を含む、(1)

または (2) に記載のタンパク質に結合するタンパク質のスクリーニング方法、

(10) (1) または (2) に記載のタンパク質に被検遺伝子の遺伝子産物を接触させ、(1) または (2) に記載のタンパク質に結合する遺伝子産物に対応する遺伝子を選択する工程を含む、(1) または (2) に記載のタンパク質に結合するタンパク質をコードする遺伝子のスクリーニング方法、

(11) (1) または (2) に記載のタンパク質に結合するタンパク質、

(12) (9) に記載の方法により単離しうる、(11) に記載のタンパク質

(13) (1) または (2) に記載のタンパク質に結合するタンパク質をコードする遺伝子、

(14) (10) に記載の方法により単離しうる、(13) に記載の遺伝子、

(15) (1) または (2) に記載のタンパク質に結合する抗体、

(16) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質に結合する抗体、に関する。

【0008】

なお、本発明において「PDZドメイン配列」とは、「Gly-Leu-Gly-Phe」または

その類似アミノ酸からなる4アミノ酸のモチーフを含む約80乃至90アミノ酸からなる配列を指す (TIBS 20,p102-103(1995)参照)。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明は、PDZドメイン配列を有する新規なタンパク質に関する。PDZドメインを有するタンパク質群は、少数の例外はあるものの、共通して、タンパク質のC末端領域に存在する疎水性アミノ酸の領域を持った他のタンパク質と相互作用していることが知られている。それらのタンパク質の多くは膜貫通型のタンパク質であり、細胞内でのシグナル伝達の機能を果たしていることが予想されている (TIBS 21, 455-458 (1996)、 J. Yanagisawa et al. (1997) J.Biol. Chem. 272, 7167-7172)。

【0010】

本発明のタンパク質に含まれる配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質は、アミノ酸配列中の、69～158位 (配列番号：4)、371～461位 (配列番号：5)、520～615位 (配列番号：6)、649～734位 (配列番号：7)、782～865位 (配列番号：8)、928～1013位 (配列番号：9)、1024～1108位 (配列番号：10)、1161～1249位 (配列番号：11)、1286～1373位 (配列番号：12) に9つのPDZドメイン配列を有している (図8参照)。

【0011】

また、同じく本発明のタンパク質に含まれる配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質は、配列番号：1に記載のアミノ酸配列の第369から1373位に相当するタンパク質である。これらのタンパク質間の構造の相違は、mRNAの転写開始部位の相違に起因していると考えられる。

【0012】

配列番号：2に記載のタンパク質は、アミノ酸配列中の、3～93位、152～247位、281～366位、414～497位、560～645位、656～740位、793～881位、918～1005位に8つのPDZドメイン配列を有している。しかしながら、配列番号：1に記載のタンパク質における最初のPDZドメインを有しない。この生物学的な意味合いは明確ではないが、配列番号：2に記載のタンパク質に対応するmRNAの肝臓での

発現特異性（実施例 5）、および PDZ ドメインがタンパク質-タンパク質間の相互作用に重要なドメインであることを考慮すると、配列番号：2 に記載のタンパク質は、このドメインが消失することにより肝臓細胞で他の組織とは異なるシグナルの制御に関連していると考えられる。

【0013】

配列番号：1 および 2 に記載のタンパク質がヒト由来のタンパク質であることは、他の動物由来のタンパク質であることに比して、臨床上非常に重要な意義を有する。即ち、他の生物（例えば、マウスやラット）由来のタンパク質では、ヒトの治療などに応用する際に免疫原性の点で抗体が派生して治療効果が低減したり、無効になったり、血清病やアナフィラキシーショックを生じるなどの重大な副作用が生じるおそれがある。従って、ヒトの治療の材料としては、特に、ヒト由来のタンパク質であることが望ましい。

【0014】

本発明のタンパク質は、天然のタンパク質の他、遺伝子組み換え技術を利用した組換えタンパク質として調製することが可能である。天然のタンパク質は、当業者に周知の方法、例えば、後述する本発明のタンパク質に対する抗体を適当な担体に結合させたアフィニティーカラムにより、ヒトのさい帯血内皮細胞（HUVEC）などから単離することが可能である。アフィニティーカラムの作製については、例えば、Wilchek らの方法（Wilchek et al. Methods Enzymol. 104, p. 3-55 (1984)）に従って行うことが可能である。一方、組換えタンパク質であれば、後述の本発明のタンパク質をコードする DNA で形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。

【0015】

また、本発明のタンパク質には、配列番号：1 および 2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質の機能的誘導体も含まれる。「機能的誘導体」とは、アミノ酸の置換、欠失、付加などにより、アミノ酸配列において、配列番号：1 または 2 に記載のアミノ酸配列と比較して 1 箇所以上のアミノ酸が異なるが、PDZ ドメインに特徴的な他のタンパク質との親和性を保持しているタンパク質を指す。この親和性は、通常、他のタンパク質の C 末端領域に存在する疎水性アミノ酸領域と

1

【 0 0 1 6 】

mol, 85, p2763-2766 (1988)) やPCR (polymerase chain reaction反応) を利用し

た方法などがある。Kunkel法では、鋳型となる1本鎖DNAを調製する際に、宿主として dut^- 、 ung^- の大腸菌を利用することでウラシルを取り込ませる。このウラシルを含む鋳型に導入したい変異を含むプライマーをアニーリングさせ、通常のDNA合成をin vitroで行う。これにより調製したウラシルを含むDNA鎖との二本鎖DNAを、通常の大腸菌に取り込ませると、ウラシルを含んだDNA鎖は壊され、変異の導入されたDNAが鋳型となってDNA合成が行われる。この結果、非常に効率的に変異の導入されたDNAを得ることができる。一方、PCRを利用した変異の導入は、例えば、適当な制限酵素の認識部位の中に含む領域を標的にして変異を導入したい部分の配列を含むプライマーと制限酵素の認識部位またはその外側の配列を含むプライマーを2種類作製してPCRを行い、そのPCR産物を混合した後に2つの制限酵素の認識部位またはその外側の配列を含むプライマーでDNAを増幅し、その中に変異を導入した領域が含まれるように適当な制限酵素で消化し、もとのDNAの当該領域と入れ替えることで変異が導入できる (Saiki et al.1988 Science 239,p487-491;Current Protocol in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley-interscience出版, Unit 8.5.1-8.5.10 (1997)、実験医学別冊 新遺伝子工学ハンドブック, 羊土社, p251-261)。なお、機能的誘導体において置換されるアミノ酸の数は、通常、10アミノ酸以内であり、好ましくは6アミノ酸以内であり、さらに好ましくは3アミノ酸以内である。

【0017】

また、本発明は、上記本発明のタンパク質をコードするDNAに関する。本発明のタンパク質をコードするDNAは、cDNAでも、ゲノムDNAでもよく、また合成DNAであってもよい。本発明のDNAは、例えば、本発明のタンパク質を組換えタンパク質として生産するために利用しうる。即ち、本発明のタンパク質をコードするDNA（例えば、配列番号：3に記載のDNA）を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させタンパク質を精製することにより本発明のタンパク質を組換えタンパク質として調製することが可能である。

【0018】

組換えタンパク質の生産に用いる細胞としては、例えば、動物細胞としてはCH

O細胞(Chinese hamster ovary cell)、COS細胞(サルCV-1繊維芽細胞を複製起点を欠いたSV40ウイルスでトランスフォームした細胞株)、マウスNIH3T3細胞、ヒトHela細胞、ヒトリンパ球系のナマルバ細胞などが挙げられるが、これらに限らない(Current Protocol in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, Unit 16.12-16.14(1991))。ベクターとしては、pSV2neoやpcDNA1, pCD8, pRCRSV, pREP4, pCEP4 (インビトロジェン社)、pMAM, pMAMneo (クロンテック社)、pCI-neo mammalian expression vector, pSI-neo mammalian expression vector, pTARGETTM mammalian expression vector (プロメガ社)などが好適に用いられる。プラスミドベクターに限らず、組み換えウイルスを作製して組み換えタンパク質の生産に用いることもできる。pAdexベクターを用いた組み換えアデノウイルス(実験医学別冊 新遺伝子工学ハンドブック、羊土社、p238-244)、LNやLXSNベクターシリーズ、その改変型pBabeベクターシリーズ、MFGベクターなどを用いた組み換えレトロウイルス(実験医学別冊 新遺伝子工学ハンドブック、羊土社、p245-250、Current Protocol in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley-interscience出版, Unit 9.10.1-9.14.3(1992))、シンドビスウイルス、ワクシニアウイルス(Current Protocol in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley-interscience出版, Unit 16.15.1-16.19.9(1992))などによっても組み換えタンパク質の生産を行うことができる。バキュロウイルスを利用した組み換えタンパク質の生産も可能であり、カイコの幼虫、またSF21, SF9, High FiveTM細胞などの培養細胞株を宿主として利用することもできる(実験医学別冊 バイオマニュアルシリーズ7 分子生物研究のためのタンパク実験法, 羊土社, p167-171(1994)、O'Reilly, D.R. et al.: Baculovirus expression vectors, A laboratory Manual, Oxford University Press(1992))。バキュロウイルス発現ベクターとしてはpBacPAK8, 9, pBacPAK-His1/2/3やpAcUW31(クロンテック社製)、pBlueBac(インビトロジェン社)、pBAC, pBACgus(Novagen社製)などが挙げられる。

【0019】

タンパク質を効率よく発現させるために、動物細胞において用いられるプロモーターとしては、例えば、SV40初期プロモーター(Rigby In Williamson (ed),

Genetic Engineering, Vol.3. Academic Press, London, p.83-141(1982)), EF-1 α プロモーター(Kimら Gene 91, p.217-223 (1990)), CAGプロモーター(Niwa et al. Gene 108, p.193-200 (1991)), RSV LTRプロモーター(Cullen Methods in Enzymology 152, p.684-704 (1987)), SR α プロモーター(Takebe et al. Mol. Cell. Biol. 8, p.466 (1988)), CMV初期プロモーター(Seed and Aruffo Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, p.3365-3369 (1987)), SV40後期プロモーター(Gheysen and Fiers J. Mol. Appl. Genet. 1, p.385-394 (1982)), アデノウイルス後期プロモーター(Kaufman et al. Mol. Cell. Biol. 9, p. 946 (1989)), HSV TKプロモーターや誘導的発現プロモーターが挙げられる。誘導的発現プロモーターとしては、例えば、グルココルチコイドで誘導されるMMTVプロモーターやホルボールエステルや重金属で誘導されるMT (メタロチオネイン) IIプロモーター、テトラサイクリンでオン/オフが可能なTet-On/offシステム (クロンテック社製)、エクジソンで誘導できる発現システム (Invitrogen社製) やIPTGで誘導発現を行うLacスイッチシステム (ストラタジーン社製) などが好適である。

【0020】

また、酵母細胞でもタンパク質の生産が可能である。プロテアーゼ欠損株であるBJ2168, BJ926, CB023や分泌ベクター用の酵母株20B-12などが宿主として利用できる(実験医学別冊 バイオマニュアルシリーズ4 遺伝子導入と発現解析法, 羊土社, p166-176(1994))。発現ベクターとしては、例えば、pYEUra3 (クロンテック社製)、pYEXTM-BX, pYEXTM-S1が挙げられる。分裂酵母の発現ベクターpESP-1 (ストラタジーン社製) を用いて分裂酵母SP-Q01株で発現することも可能である。酵母細胞においてタンパク質を効率的に発現させるためのプロモーターとしては、構成的に発現させるPGKプロモーター、ADH1プロモーター、銅イオンで誘導できるCUP1プロモーター、ガラクトースにより誘導されグルコースにより抑制されるGal1-Gal10プロモーター、リン酸濃度の低下により誘導され高リン酸濃度により抑制されるPH05プロモーターなどが好適に用いられる。分裂酵母ではnmt1プロモーターなどが好適に用いられる。

【0021】

大腸菌による組み換えタンパク質の生産には、大きく4種類の発現プロモータ

ーが使用できる。 λ PLプロモーターはcIts857リプレッサーにより発現が調節され、熱ショックにより発現が誘導される。宿主としてはN4830-1, M5219が挙げられ、pPL-lambda, pKC30, pRIT2Tなどのベクターにより発現できる。tacプロモーターはlacI^qリプレッサーにより発現が調節され、イソプロピル β -D-チオガラクトシド (IPTG) の添加により発現が誘導される。宿主としてはJM105, XL1-Blueが挙げられ、pDR540, pKK233-3, pGEX-3X, pMAL-c2などのベクターにより発現することができる。trpプロモーターはtrpリプレッサーにより発現が制御され、 β インドールアクリル酸 (IAA) の添加により発現が誘導される。宿主としてはHB101などを使用できる。pBTrp2などのベクターにより発現することができる。T7ファージプロモーターはT7RNAポリメラーゼによってのみ認識され発現できるため、例えば、 λ ファージDE3のint遺伝子内にlacI遺伝子、lacUV5プロモーターの支配下のT7 RNAポリメラーゼ遺伝子を含むDNA断片が挿入されていて、これを大腸菌BL21株に溶原化させたBL21 (DE3) 株が宿主として使用でき、IPTGの添加によりT7RNAポリメラーゼが誘導されて、T7プロモーターからの誘導発現が可能になる。ベクターとしてはpET-3c, pET-8cなどを使用できる。基底レベルのT7RNAポリメラーゼを抑制するために、T7RNAポリメラーゼに結合して転写を阻害する天然の阻害剤であるT7リゾチームを供給するプラスミドを共存させたBL21 (DE3) pLysSも宿主として使用できる。T7プロモーターの転写開始点の下流にlacオペレーター配列を挿入したT7lacプロモーターを持つpET-11c, pET-11dなども発現ベクターとして挙げられる (F.Studier et al.: J.Mol.Biol.189,p113-130(1996)、F.Studier et al.: Methods Enzymol.185,p60-8(1990))。

【0022】

宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、エレクトロポレーション法 (Chu, G. et al. Nucl. Acid Res. 15, 1311-1326 (1987))、リン酸カルシウム法 (Chen, C and Okayama, H. Mol. Cell. Biol. 7, 2745-2752 (1987))、DEAEデキストラン法 (Lopata, M. A. et al. Nucl. Acids Res. 12, 5707-5717 (1984); Sussman, D. J. and Milman, G. Mol. Cell. Biol. 4, 1642-1643 (1985))、リポフェクチン法 (Derijard, B. Cell 7, 1025-1037 (1994); Lamb, B. T. et al. Nature Genetics 5, 22-30 (1993); Rabindran, S. K. et al. Science 259, 230-

234 (1993))等の方法により行うことができるがいずれの方法によってもよい。

【0023】

得られた形質転換体からの組換えタンパク質の精製は、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイト、水素結合クロマトグラフィー、キレートカラムにより精製することができる (Deutscher, M.P. ed.: Methods Enzymol. 182, Guide to Protein Purification, 1990、Principles and Methods シリーズ: Gel Filtration, Ion Exchange Chromatography, Affinity Chromatography, ファルマシア社)。また、後述するように本発明のタンパク質に対する抗体を調製すれば、その抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーによりタンパク質を高い精製度で精製することが可能である。

【0024】

また、当業者であれば、調製した本発明のタンパク質を用いてこれに結合する抗体を調製することも容易に行いうる。本発明の抗体は、本発明の遺伝子を適当な大腸菌発現ベクターにて発現し、精製し、これをウサギやマウス、ラット、ヤギ、ニワトリなどに免疫することにより得ることができる。また、本発明の遺伝子がコードするタンパク質の適当な領域をペプチド合成し、これを上記の動物に免疫することによってもこの遺伝子産物に対する抗体を得ることができる。また、モノクローナル抗体の作成方法としては、マウスやラットのハイブリドーマを確立する方法が挙げられる (Kohler and Milstein, Nature 256, p495-497 (1975))。具体的には、調製した本発明のタンパク質をマウス、ラット、アルメニアンハムスターに免疫した後、抗体産生細胞を脾臓またはリンパ節より取り出し、in vitro でミエローマ細胞と融合させて、抗原を用いたスクリーニングを行いクローンを選択する (Harlow, E, and Lane, D.: Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1988))。マウスミエローマ細胞としては、p3-x63-Ag8-U1 (P3-U1), P3-NSI/1-Ag4-1 (NS-1), SP2/0-Ag14 (AP2/0) が、ラットミエローマ細胞としては、YB2/3HL.P2G11.16Ag20 (YB2/0) が挙げられる。細胞の融合はポリエチレングリコールや電気パルスを用いて行うことが可能である。ハイブリドーマを培養した培養上清に含まれるモノクローナル

抗体や得られたハイブリドーマを大量培養して免疫抑制剤で処理したマウスの腹腔に注射し、マウスの腹水中に含まれるモノクローナル抗体は、例えば、ProteinA-sepharose（ファルマシア社）により精製することができる。さらには、本発明のタンパク質を固定したアフィニティーカラムによっても精製することができる（Harlow, E. and Lane, D.: Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1988)）。

【0025】

得られた抗体を人体に投与する場合には、免疫原性を低下させるために、ヒト抗体またはヒト型化抗体を用いると有効である。抗体をヒト型化する方法としては、モノクローナル抗体生産細胞から抗体遺伝子をクローニングし、その抗原決定部分を既存のヒト抗体に移植するCDRグラフト法（In immunology Methods Manual 1, p98-107, Academic Press）が挙げられる。またヒト抗体は、免疫系をヒトのものと入れ換えたマウスに免疫して、通常のモノクローナル抗体と同様に作成することができる。ヒトB細胞ハイブリドーマ法（Kozbor et al. Immunology Today 4, p72 (1983)）、エプシュタインバールウイルス（EBV）-ハイブリドーマ法（Cole et al. in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. p77-96 (1985)）などによってもヒトモノクローナル抗体を作製できる。

【0026】

これにより得られた抗体は、本発明のタンパク質の検出や抗体治療に用いることができるだけでなく、後述する本発明のタンパク質に相互作用するタンパク質のスクリーニングに用いることが可能である。

【0027】

また、本発明は、本発明のタンパク質に結合するタンパク質のスクリーニング法に関する。本発明のタンパク質のようにPDZドメインを有するタンパク質群は、共通して、C末端に疎水性アミノ酸の領域を持った他のタンパク質と相互作用していることが知られている。本発明のスクリーニング法を利用することにより、このようなタンパク質を初めとする種々の結合タンパク質を単離することが可能である。このスクリーニング方法においては、本発明のタンパク質に被検タンパク質を接触させ、本発明のタンパク質に結合するタンパク質を選択する工程を含

む。被検タンパク質は、例えば、目的のタンパク質を含むことが予想される細胞や組織由来の溶解液として本発明のタンパク質に接触させる。

【0028】

具体的な方法の一例として免疫沈降法が挙げられる。免疫沈降法は、タンパク質とタンパク質との結合を検出するために用いられる最も一般的な方法である。免疫沈降は、通常、本発明のタンパク質に細胞や組織由来の溶解液、例えば、ヒトさい帯内皮細胞などの細胞をTriron X-100やデオキシコール酸ナトリウムなどで溶解した細胞溶解液などの生物学的試料を接触させ、これにより形成される本発明のタンパク質とこれに結合するタンパク質からなる複合体に、抗体を作用させて免疫複合体を形成させ、これを沈降させるという手法による（実験医学別冊新遺伝子工学ハンドブック, 羊土社, p304-308(1996)）。

【0029】

免疫複合体の沈降は、例えば、抗体がマウスIgG抗体であれば、プロテインAセファロースやプロテインGセファロースを用いて行うことができる。これらの一般的な方法については例えば、「Harlow, E. and Lane, D.: Antibodies, pp.511-552, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York (1988)」の方法に従えばよい。また、他の動物由来の抗体であっても一般的なこれらの方法に準じて行えばよい。

【0030】

また、免疫沈降に用いる本発明のタンパク質は、例えば、特異性の明らかとなっているモノクローナル抗体の認識部位（エピトープ）がタンパク質のN末端またはC末端に導入されていてもよい。このようにエピトープとの融合タンパク質とすれば、該エピトープに対する抗体を反応させることにより、免疫複合体を形成させることができる。

【0031】

用いるエピトープ-抗体系としては市販されているものが多くあるので、それらを利用することも可能である（実験医学 13, 85-90 (1995)）。例えば、マルチクローニングサイトを介して所望のタンパク質をコードするDNAを組み込むことにより、 β -ガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-

トランスフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質 (Green fluorescent protein) などとの比較的大きな融合タンパク質を発現できるベクターが市販されている。融合タンパク質にすることによりもたらされる目的のタンパク質の性質の変化を最小限にするために、数個から十数個のアミノ酸からなる小さなエピトープ部分だけを導入する方法も報告されている。その例としては、ポリヒスチジン (His-tag)、インフルエンザ凝集素HA、ヒトc-myc、FLAG、水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質 (VSV-GP)、T7遺伝子10タンパク質 (T7-tag)、ヒト単純ヘルペスウイルス糖タンパク質 (HSV-tag)、E-tag (モノクローナルファージ上のエピトープ) などのエピトープとそれを認識するモノクローナル抗体が使用できる (実験医学 13, 85-90 (1995))。これら以外にも融合タンパク質を検出できるのであれば、どのようなエピトープ-抗体系を用いてもよい。なお、融合タンパク質の場合には、抗体を用いなくとも、アフィニティークロマトグラフィーを用いて本発明のタンパク質に結合するタンパク質を単離しうる。例えば、GST融合タンパク質の場合には、グルタチオン-セファロース4Bカラムを用いればよい。

【0032】

免疫沈降されたタンパク質の解析にはSDS-PAGEが一般的に用いられ、適当な濃度のゲルを用いることで、タンパク質の分子量により、結合したタンパク質を解析することができる。また、この際、一般的には結合していたタンパク質は、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色や銀染色のようなタンパク質の通常の染色法で検出することは困難であるので、細胞培養時に³⁵S-メチオニンや³⁵S-システインを含んだ培養液で培養することでタンパク質をラベルすると検出感をあげることができる。分子量が明らかとなれば、直接SDS-ポリアクリルアミドゲルから該当するタンパク質を精製し、その配列を決定することもできる。上記免疫沈降法以外の方法としては、本発明のタンパク質を固定したアフィニティークラムに本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞の培養上清もしくは細胞抽出物を通過させ、カラムに特異的に結合するタンパク質を精製することにより調製することも可能である。

【0033】

また、本発明のタンパク質を用いてこれに結合するタンパク質をコードする遺

伝子を直接スクリーニングすることも可能である。このスクリーニング法は、本発明のタンパク質に被検遺伝子の遺伝子産物を接触させ、本発明のタンパク質に結合する遺伝子産物に対応する遺伝子を選択する工程を含む。被検遺伝子としては、特に制限はない。例えば、本発明のタンパク質に結合するタンパク質が発現していると考えられる所望の細胞から調製したcDNAライブラリーが好適に用いられる。具体的な方法の一例として、酵母の2ハイブリッド系を利用する方法が挙げられる (Fields, S. and Song, O. Nature 340, 245-247 (1989))。即ち、本発明のタンパク質をSRF結合領域、GAL4結合領域またはLexA結合領域に融合させて酵母細胞の中で発現させ、本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞より、VP16、GAL4転写活性化領域、またはB42大腸菌ペプチドと融合する形で発現するようなcDNAライブラリーを作製し、これを上記酵母細胞に導入し、検出された陽性クローンからライブラリー由来cDNAを単離する (酵母細胞内で本発明のタンパク質と結合するタンパク質が発現すると、両者の結合によりレポーター遺伝子が活性化され、陽性のクローンが確認できる)。

【0034】

この系に用いられるベクターおよび発現ライブラリーは購入することができるので、これを利用してもよい (クロンテック社、MATCHMAKER Two-Hybrid System; ストラタジーン社、HybriZAP II Two-Hybrid System)。具体的な方法についてはこれらのマニュアルに従えばよい。この方法により本発明のタンパク質に結合するタンパク質をコードする遺伝子を直接得ることができる。実際にこの酵母の2ハイブリッド系を用いてAPCとhDLGの結合 (A. Matsumine et al. Science 272, 1020-1023 (1996)); GRIPとAMPAレセプターの結合 (H. Dong et al. Nature 386, 279-284 (1997)); Homerとグルタミン酸レセプターの結合 (P. R. Brakeman et al. Nature 386, 284-288 (1997)); SRYとSIP-1の結合 (F. Poulat et al. J. Biol. Chem. 272, 7167-7172 (1997))などが確認され、PDZドメインを有するタンパク質の標的タンパク質が同定されている。

【0035】

また、本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞 (例えば、ヒトさい帯内皮細胞など) よりファージベクター (λ gt11、

ZAPなど)を用いたcDNAライブラリーを作製し、これをLB-アガロース上で発現させ、フィルターに発現させたタンパク質を固定し、本発明のタンパク質をビオチンラベルするか、またはGSTタンパク質との融合タンパク質として精製し、これを上記フィルターと反応させ、結合するタンパク質を発現しているプラークを、ストレプトアビジン、あるいは抗GST抗体により検出する「ウエストウエスタンブロッティング法」(Skolnik EY, Margolis B, Mohammadi M, Lowenstein E, Fischer R, Drepps A, Ullrich A, and Schlessinger J (1991) Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases. Cell 65, 83-90)を用いてスクリーニングすることも可能である。なお、これにより単離された遺伝子を大腸菌などに導入して発現させることにより、該遺伝子がコードするタンパク質を調製することも可能である。

【0036】

このような本発明のタンパク質を用いてこれに結合するタンパク質またはその遺伝子を単離し、解析することにより、このタンパク質-タンパク質相互作用を介したシグナル伝達経路の解明が可能となると考えられる。さらに、このようなシグナル伝達と疾患との関連が明らかになれば、本発明のタンパク質やこれと相互作用するタンパク質を標的とした医薬品の開発が可能となる。

【0037】

また、これらタンパク質をコードするDNAに対するアンチセンスDNAを用いた治療なども可能になると考えられる。本発明において「アンチセンスDNA」とは、標的遺伝子の転写産物に相補的なRNAをコードするDNAであって、標的遺伝子の発現を抑制する活性を有するDNAを指す。アンチセンスDNAは、遺伝子の発現を有効に抑制しうる限り、標的遺伝子の転写産物に対して完全に相補的でなくともよい。好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の相補性を有する。アンチセンスDNAの鎖長は、少なくとも15塩基以上、好ましくは100塩基以上、さらに好ましくは500塩基以上である。アンチセンスDNAとしては、種々の修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドが利用されているが、例えば、ホスホロチオネート(S-オリゴ)は安定性、水溶性において好適である。アンチセンスDNAの導入法としては、直

接投与法、リポフェクション、HVJ法、HVJ-リポソーム法などが挙げられる。また、ベクターを用いたアンチセンスRNAによる治療も可能であり、この場合には、前述の動物細胞での組み換えタンパク質の作製に用いたベクターに本発明のDNAを逆向きに導入し、直接投与法、リポフェクション、HVJ法、HVJ-リポソーム法などで導入し体内で発現させるなどして遺伝子治療を行うことが可能である。また、アデノ関連ウイルス、アデノウイルス、ヒト単純ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ファウルボックスウイルスなどのウイルスベクターを用いた遺伝子導入法によりアンチセンスRNAを体内で発現する方法も可能である。また、アンチセンスDNA以外に、リボザイムを利用した治療も考えられる。

【0038】

【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0039】

【実施例1】 遺伝子のクローニング

(1) ディファレンシャル・ディスプレイ

HUVEC(ヒトさい帯血管内皮細胞)を森永生科学研究所より入手し、正常ヒト血管内皮細胞培養キット (Catalog #680051)を用いて培養し、サブコンフルエントの状態になったところで10ng/mlのTNFアルファ(Recombinant Human Tumor Necrosis Factor- α 、Catalog #300-01A、PEPROTECH Inc.)を添加し、24時間培養し、無添加の細胞と発現している遺伝子を比較した。トリプシン-EDTAで細胞を剥離し、1000rpm、5分の遠心操作により細胞を沈殿させ、一度PBSにて洗浄したのち、RNAeasy Total RNAキット(キアゲン社)により全RNAを回収した。回収した全RNAのうち0.2 μ gを用いて、H-T11GアンカープライマーによりcDNAを合成した。条件はRNAimageキット(ジェンハンター社)に添付のマニュアルに従い、アービタリープライマー、H-AP1からH-AP8の8種類のプライマーについて94℃30秒、40℃2分、72℃30秒のサイクルを40回行うポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により、TAKARA Taqポリメラーゼを用いてランダムに遺伝子を増幅した。反応液にはアルファ³²P dATPが含まれており、シーケンスゲル泳動にて分離した。TNFアルファの

刺激によりバンドが濃くなっているもの、つまり、mRNAの発現が無刺激に比べて上昇しているものを再度同じ条件にて増幅し、増幅された断片をQiaquickスピンPCR精製キットを使用して、反応液中に存在するプライマーDNAを除去し、増幅に用いた同じプライマーを用いてダイターミネーターサイクルシーケンシングFSレディリアクションキット (Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction kit/パーキンエルマー社、Catalog #402122) により解析することにより、配列番号: 13に示す「DDEST32」の塩基配列の情報が得られた。

【0040】

(2) cDNAライブラリーの構築

ZAP-cDNA合成キット (ストラタジーン社) を用いてcDNAライブラリーを構築した。5 μ lの10x第1鎖バッファー、3 μ lの第1鎖メチルヌクレオチドミックス、2 μ lのリンカープライマー (1.4 μ g/ μ l)、1 μ lのRNaseプロックリボヌクレアーゼ阻害剤 (40 μ / μ l)、10 μ lのTNFアルファ刺激HUVECポリA⁺mRNA (0.5 μ g/ μ l)、24 μ lのDEPC (ジエチルピロカルボネート) 処理済みの水を穏やかに混合し、室温で10分放置した。5 μ lのSuperScript II逆転写酵素 (200 μ / μ l) (GIBCO-BRL社) を混合し、37℃にて40分間保温し、さらに45℃にて70分保温した。反応液を氷上に置き、45 μ lの第1鎖反応液に20 μ lの10x第2鎖バッファー、6 μ lの第2鎖ヌクレオチド混合物、115.9 μ lの滅菌蒸留水、Rnase H (1.5 μ / μ l)、11.1 μ lのDNAポリメラーゼI (9 μ / μ l) をボルテックスして混合し、16℃で150分間保温した。反応後、23 μ lのブランチングdNTPミックス (blunting dNTP mix)、2 μ lのクローン化Pfu DNAポリメラーゼ (cloned Pfu DNA polymerase) (2.5 μ / μ l) を加えて、72℃にて30分間保温した。200 μ lのフェノール/クロロホルム、クロロホルムで順次抽出し、さらに20 μ lの3M 酢酸ナトリウム、400 μ lの100%エタノールにて沈殿させた。-20℃で一晩置いた後、15,000回転で60分間 (4℃) の遠心操作により得られた沈殿は、500 μ lの70% エタノールで洗浄し乾燥させた。0.4 μ g/ μ lの濃度のEcoR Iアダプター9 μ lで沈殿を溶かし、4℃で45分置いた。1 μ lの10xリガーゼバッファー、1 μ lの10mM ATP、1 μ lのT4 DNAリガーゼ (4 μ / μ l) を添加し、8℃にて一晩連結反応を行った。70℃にて30分保温し、酵素を失活させ、遠心操作で反応液をチューブの底に集めた後、5分間室温に放置した。1 μ lの10xリガーゼ

バッファー、 $2\mu\text{l}$ のATP、 $6\mu\text{l}$ の滅菌水、 $1\mu\text{l}$ のT4ポリヌクレオチドキナーゼ($10\mu/\mu\text{l}$)を加え、 37°C で30分保温した後、 70°C で30分保温して酵素を失活させた。 $28\mu\text{l}$ のXho Iバッファー補助 (buffer supplement)、 $3\mu\text{l}$ のXho I($40\mu/\mu\text{l}$)を加え、 37°C 90分間反応させた。室温に戻した後、 $5\mu\text{l}$ の10xSTEバッファーを添加し、Sephacryl S-500カラムにかけて、 $60\mu\text{l}$ の1xSTEバッファーで2回溶出し、 $120\mu\text{l}$ のエタノールを加えて、 -20°C で一晩置いた。 $15,000$ 回転で60分間 (4°C) 遠心し、沈殿を得た。 $200\mu\text{l}$ の80%エタノールで洗い、さらに沈殿を乾燥させた。 $6\mu\text{l}$ の滅菌水で溶解してそのうちの $2.5\mu\text{l}$ を用いてベクターへの連結反応を行った。 $2.5\mu\text{l}$ のcDNAに対して、 $1\mu\text{l}$ のUni-ZAP XRベクター($1\mu\text{g}$)、 $0.5\mu\text{l}$ の10xリガーゼバッファー、 $0.5\mu\text{l}$ の10mM ATP、 $0.5\mu\text{l}$ のT4 DNAリガーゼ($4\mu/\mu\text{l}$)を加えて 12°C にて一晩反応させた。ギガパックIIIゴールドパッケージングエクストラクトに $1\mu\text{l}$ のライゲーション混合液を添加し、良く混合し、室温にて2時間保温した。 $500\mu\text{l}$ のSMバッファー(5.8g NaCl 、 $2.0\text{g MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 50ml 1M Tris-HCl (pH7.5)、 5ml 2% (w/v)ゼラチンを脱イオン水で1Lとしたもの)を加え、さらに $20\mu\text{l}$ のクロロホルムを加えた後、穏やかに混合した。遠心し、その上清を別のチューブに移して 4°C に保存した。 $0.1\mu\text{l}$ 、 $1\mu\text{l}$ のパッケージ化反応液 (packaged reaction) を用いてファージのタイターを測定した。 $0.1\mu\text{l}$ から約300のプラークが得られたことから $1\mu\text{l}$ あたり3000PFU (plaque forming unit) と考えられた。宿主大腸菌にはXL1 Blue MRF'を用いた。 20ml LB/10mM MgSO_4 /0.2%マルトースで 37°C 6時間培養し、 OD_{600} が1.0になる前に氷上に5分置き、 $500\times\text{g}$ で10分遠心した。沈殿した菌に対して 10ml の10mM MgSO_4 を加えて懸濁し、 OD_{600} が0.5となるように10mM MgSO_4 で希釈した。 $17\mu\text{l}$ のパッケージ化反応液 (packaged reaction) を $600\mu\text{l}$ の新鮮に調製されたXL-1 Blue MRF'に加え、 37°C で15分保温した。 45°C にあらかじめ保温しておいた 6.5ml NZYトッパガー(0.7% (w/v)アガロースをNZY培地に加えオートクレーブしたもの)を加えてNZY寒天プレート(5gのNaCl、 2.0g の $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5gの酵母抽出物、 10g のNZアミン、 15g の寒天を脱イオン水で1Lとしたもの、pHはNaOHで7.5に調整し、オートクレーブ後、滅菌済みのシャーレにまいたもの)にまいた。 37°C で6時間培養し、Hybond N+ filter(アマシャム社、RPN203B)をプレート上においてプラークを移し、 1.5M NaCl /0.5M NaOHで

7分間変性させた後、1.5M NaCl/0.5M Tris-HCl (pH7.2)/1mM EDTAで5分間処理することにより中和し、最後に2XSSCでリンスした。乾燥させたのち、StrataLinker (ストラタジーン社) を用いて120mJのUVでフィルターにブランクを固定した。

【0041】

(3) cDNAライブラリーのスクリーニング

「DDEST32」のDNA断片は2%アガロースゲルにより分離し、QIAEX IIゲル抽出キット (キアゲン社) によりアガロース切片から回収した。これをプローブとして、ランダムラベルによりラベルした。メガプライムキット (アマシャム社、RP N1607) を用い、25ngのプローブDNAに対して5 μ lのプライマー溶液を加えて、95℃にて5分保温した。室温にて放置し、さらに10 μ lのラベリングバッファー、18 μ lの水、アルファ³²P dCTP、2 μ lのクレノウ・フラグメントを混合し、37℃で30分間保温した。2 μ lの0.5M EDTAを添加して反応を停止させ、ファルマシアProbeQuant G-50カラムにて遊離のアルファ³²P dCTPを除去した。60℃にてラピッドハイブリバッファー (Rapid hybridization buffer/アマシャム社、RPN1636) でプレハイブリダイゼーションした後、標識したプローブを95℃で熱変性させ、氷上で急冷し、ハイブリバッファーに添加し、60℃で2時間振とうしながらハイブリダイゼーションさせた。プローブは 2×10^6 cpm/mlの濃度で用いた。フィルターに対し、2XSSC/0.05%SDSを用いて室温で10分の洗浄を3回行い、さらに0.1XSSC/0.1%SDSで60℃で20分の洗浄を2回行った。陽性ブランクから採取したファージはSMバッファーで希釈し、10cmシャーレに約100ブランクが形成されるように希釈してまいた。こうして2次スクリーニングを行い、さらに3次スクリーニングまで行った。その結果、陽性クローンとしてクローン「#32-8-1」を得た。Uni-ZAPベクターにクローニングされている遺伝子は、インビボ切除法により通常のプラスミドDNAとして回収した。

【0042】

[実施例2] 「32-8-1遺伝子」の配列の決定

(1) RACEのためのcDNAライブラリーの作製

マラソンcDNA増幅キット (クロンテック社) を用いてRACEのためのcDNAを合成し

た。TNFファルファ刺激したHUVEC細胞から得られた全RNA 1 μ gを用いて実験を行った。10 μ MのオリゴdTプライマーを1 μ l加え、全量5 μ lとし、70℃にて2分保温し、2分間氷上に置いた。これに2 μ lの5X第1鎖バッファー、1 μ lの10mM dNTPミックス、1 μ lの100unit/ μ lのMMLV逆転写酵素を加え10 μ lとして、42℃で1時間保温し、第1鎖cDNAを合成した。これにさらに5x第2鎖バッファー16 μ l、10mM dNTPミックス1.6 μ l、20x第2鎖酵素液 (Second-strand enzyme cocktail) 4 μ lを加え、水を加えて、全量80 μ lとして16℃で90分間保温した。5units/ μ lのT4 DNAポリメラーゼ2 μ lを添加した後、16℃45分の反応を行った。4 μ lの20XEDTA/グリコーゲンを添加した後、等量のフェノール/クロロフォルム、イソアミルアルコール/クロロフォルムで除タンパク質を行った。

【0043】

35 μ lの4M酢酸アンモニウム、263 μ lの95%エタノールでエタノール沈殿を行い、80%エタノールで洗浄し、10分間自然乾燥させた。脱イオン水10 μ lに溶解し、7.5 μ lを使ってアダプターの連結反応を行った。3 μ lの10 μ M マラソンcDNAアダプター、3 μ lの5XDNAライゲーションバッファー、1.5 μ lの(1units/ μ l)T4 DNAリガーゼを加えて、16℃にて1晩反応させた。70℃5分の保温により、酵素を失活させ、キットに添付のトリシン-EDTAバッファー135 μ lを加えて全量150 μ lとした。

【0044】

(2) RACEによるcDNAクローンのクローニングと塩基配列の決定

クローン#32-8-1は遺伝子内にある制限酵素認識部位、Pst I、Xba I、BamH I、EcoRIを利用してサブクローニングを行い、ダイターミネーターサイクルシーケンシングFSレディーリアクションキット (Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction kit/パーキンエルマー社、Catalog #402122) を用いたサイクルシーケンス法にて塩基配列を決定した。

【0045】

表1に、用いたプライマーの配列を示す。「C」は相補鎖DNAに対するプライマーであることを示す。

【0046】

【表 1】

プライマー番号		DNA配列	
106	C	CTCCCCATCCCTCGTCCACC	(配列番号 : 14)
XE	C	CTCTGACTCTGACTGACTGG	(配列番号 : 15)
EX		ATGAGTTTGGTTACAGCTGG	(配列番号 : 16)
402		TCAGAGAGCGTTATGGAACC	(配列番号 : 17)
XER		AGTCTTGCTGGGAACAAAGA	(配列番号 : 18)
801		ACTGTTACTACTTCTGATGC	(配列番号 : 19)
1192-1161		TCTGATGGTCCCACAGTCTG	(配列番号 : 20)
1282	C	GTTGTTTCGCAGCCAGGGAT	(配列番号 : 21)
1524		CTGAGCATCGTTGGGGGTTT	(配列番号 : 22)
1449	C	CCTCATCTCTGTAGAGTGTC	(配列番号 : 23)
1683		TGTTAGCCCCCTCACTAAGG	(配列番号 : 24)
1803		GCTATGTGCTAGGAAATACG	(配列番号 : 25)
2116		TAGGGAGAAGGATCAGAGCG	(配列番号 : 26)
607-93		ACAGATTTCTGACTCACTGG	(配列番号 : 27)
128		TGGAAATAGGCATTCTTCAG	(配列番号 : 28)
607-462		ATACAAAGACGGTCTAATCC	(配列番号 : 29)
2920	C	CCGCTTTCCCATCTTTAGAAAC	(配列番号 : 30)
3121		TATCTCGTGTGGAAGATGTG	(配列番号 : 31)
2266-107	C	ACATAAATGTTGCTATCACC	(配列番号 : 32)
3361		TGCCACTTAGTAGCCGAGTG	(配列番号 : 33)
3615		GCATTGCATTACAGTTGAGC	(配列番号 : 34)
1301	C	TCCTCCTTTGACAATGTCTG	(配列番号 : 35)
BXR	C	CATTTGACTGTTCTTAATC	(配列番号 : 36)
XB	C	TCAGTGGATGTGCCACAGAT	(配列番号 : 37)
4221	C	CAGTAGGTTAACTGCTTCGG	(配列番号 : 38)

BX	AGTTCCAGTCTTTCTTTCGG	(配列番号: 39)
4335	TTTCTTTCACTGGGCTGAAGTC	(配列番号: 40)
XBR	CCTCTGAAGACGGACGTCTG	(配列番号: 41)

これにより5146bpの塩基配列が決定された。EcoR Iの認識部位の最初のGの塩基を番号1とした際の468番目の塩基からPDZドメインは始まり、約80アミノ酸の繰り返し構造が3つ存在したが、その直後に終止コドンが存在していた。遺伝子の3'領域の配列にも先の終止コドンから約2kb離れたところに3個のPDZドメインが存在した(なお、このクローン#32-8-1には、約2kbのイントロンに由来する配列が転写されて挿入されており、このために最初の3つのPDZドメインの直後に終始コドンが生じていることが、後の実験で判明した)。

【0047】

そこで、後半に存在する3個のPDZドメインの位置から5' RACE(Rapid amplification of cDNA End)を行った。前述の5 μ lのcDNAを使ってキットのマニュアルに従い、5' RACEを行った。反応液は、5 μ lのcDNA、5 μ lの10xAdvantageTM KlenTaqバッファー(キット添付のものを使用)、4 μ lの2.5mM dNTP、1 μ lの10 μ M AP1プライマー(CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC(配列番号: 42))、1 μ lの10 μ M 32-8-1 5' RACEプライマー#22(TTGGGGTGGGGAGAGGAGGTAGATTGC(配列番号: 43))、1 μ lのAdvantageTM KlenTaqポリメラーゼミックス(東洋紡社 CLK8417-1)、33 μ lの脱イオン水を混合し、50 μ lとした。パーキンエルマーサーマルサイクラー2400を使ってPCR反応を行った。94℃1分、94℃5秒および72℃2分を5回、94℃5秒および70℃2分を5回、94℃5秒および68℃2分を25回の反応では鮮明なバンドを検出することはできなかった。同じ条件でネステッドPCRを行い、約1.8kbのバンドを得た。但し、プライマーはAP2プライマー(ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC(配列番号: 44))、32-8-1 5' RACEプライマー#1034(GCACATCACCAAGTGGGCTGCCTACTC(配列番号: 45))を用い、最初のPCR産物を50倍に希釈したものを5 μ l用いた。また、94℃5秒および68℃2分を25回ではなく15回でおこなった。その結果、2kbのギャップのないcDNAクローン「32-8-1/5R3」を得ることができた。

【0048】

次いで、クローン32-8-1/5R3の塩基配列の決定を行った。表2に、32-8-1/5R3の塩基配列の決定に用いたプライマーの配列を示す。「C」は相補鎖DNAに対するプライマーであることを示す。

【0049】

【表2】

プライマー番号		DNA配列
EX		ATGAGTTTGGTTACAGCTGG (配列番号: 46)
456	C	AATCTAATGCAGCTCGCCTG (配列番号: 47)
XER		AGTCTTGCTGGGAACAAAGA (配列番号: 48)
678	C	TCACTTTAGAAGGGGCACAT (配列番号: 49)
801		ACTGTTACTACTTCTGATGC (配列番号: 50)
1192-1161		TCTGATGGTCCCACAGTCTG (配列番号: 51)
1282	C	GTTGTTTCGCAGCCAGGGAT (配列番号: 52)
1524		CTGAGCATCGTTGGGGGTTT (配列番号: 53)
1449	C	CCTCATCTCTGTAGAGTGTC (配列番号: 54)
2116		TAGGGAGAAGGATCAGAGCG (配列番号: 55)
1301	C	TCCTCCTTTGACAATGTCTG (配列番号: 56)
839		TTTCATCATCTACAGCCAGT (配列番号: 57)
1389		TGACACCCTCACTATTGAGC (配列番号: 58)

クローン#32-8-1およびクローン32-8-1/5R3の塩基配列を併せて決定された2819bpの塩基配列を配列番号:59に示す。

【0050】

【実施例3】 RACEによる32-8-1/5R3cDNAクローンの5'側上流のcDNAクローンのクローニング

5' RACE(Rapid amplification of cDNA End)法により32-8-1/5R3クローンの5'側の5'側上流のcDNAクローンの単離を試みた。cDNAとしてヒト心臓のcDNAライブラリ

ーとヒト胎児肝臓のcDNAライブラリーを用いた。ヒト心臓のcDNAライブラリーからは2.8kb,1.2kbの2種類のクローンを得た。ヒト胎児肝臓のcDNAライブラリーからは1.1kbのクローンを得た。以下にクローニングの手順を示す。

【0051】

ヒト心臓のcDNAライブラリーはcDNAライブラリーヒト心臓(宝酒造社、カタログ#9604)を用いた。pAP3neo(Genebank Accession No.AB003468)ベクターに挿入されたcDNAを含むプラスミドDNAが形質転換されている大腸菌XL1 Blue-MRF'を常法により培養してアルカリ法によりプラスミドDNAを回収し、そのうちの10ngをテンプレートとして使い、PCRにより5'側の上流のcDNAクローンを得た。反応液は、10ngのcDNA, 5ulの10x Advantage™ KlenTaqバッファー(キット添付のものを使用), 4ulの2.5mM dNTP, 1ulの10uM AP3neo5'プライマー(キット添付のものを使用:5'-GCCCTTAGGACGCGTAATACGACTC-3'(配列番号:60)), 1ulの10uM 32-8-1 5' RACEプライマー#686(5'-AGCCAGTATCTGATCTCCGACTTTG-3'(配列番号:61)), 1ulのAdvantage™ KlenTaqポリメラーゼミックス(東洋紡社、CLK8417-1), 脱イオン水を混合し、50ulとした。パーキンエルマーサーマルサイクラー2400を使ってPCR反応を行った。94度1分、94度5秒および72度4分を5回、94度5秒および70度4分を5回、94度5秒および68度4分を25回の反応では2.8kb,1.2kbのバンドを検出した。0.8%アガロースゲルにて分離後、該当のバンドを切りだしてQIAquickゲル抽出キット(キアゲン社、28706)にて精製し、pGEM-TベクターシステムI(プロメガ社 A3600)のマニュアルに従いTAクローニングした。2.8kb,1.2kbの2種類のクローンそれぞれ686-1-4,686-1-2と名付けた。クローン686-1-2の配列はクローン686-1-4(配列686-1-4)の配列に含まれており、配列番号:3の1585位よりはじまり同じく2793位にて終わっていた(図7参照)。

【0052】

ヒト胎児肝臓のcDNAライブラリーとしてマラソンレディーヒト胎児肝臓cDNA(クロンテック社)を用いて5' RACEを行った。反応液は、5ulのcDNA, 5ulの10x Advantage™ KlenTaqバッファー(キット添付のものを使用), 4ulの2.5mM dNTP, 1ulの10uM AP1プライマー(キット添付のものを使用:5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'(配列番号:42)), 1ulの10uM 32-8-1 5' RACEプライマー#686(5'-AGCCAGTATCTG

ATCTCCGACTTTG-3' (配列番号: 60)), 1ulのAdvantage™ KlenTaqポリメラーゼミックス(東洋紡社、CLK8417-1), 33ul脱イオン水を混合し、50ulとした。パーキンエルマーサーマルサイクラー2400を用いてPCR反応を行った。94度1分、94度5秒および72度6分を5回、94度5秒および70度6分を5回、94度5秒および68度6分を25回の反応では鮮明なバンドを検出することはできなかった。さらに反応液を50倍に希釈し、そのうちの5ulと5ulの10xAdvantage™ KlenTaqバッファー(キット添付のものを使用), 4ulの2.5mM dNTP, 1ulの10uM AP2プライマー(キット添付のものを使用: 5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3' (配列番号: 44)), 1ulの10uM 32-8-1 5' RACEネスティッドプライマー#FLN(5'-ATTTTCACTTTAGAAGGGGCACAT-3' (配列番号: 62)), 1ulのAdvantage™ KlenTaqポリメラーゼミックス(東洋紡社、CLK8417-1), 33ulの脱イオン水を混合し、50ulとした。94度1分、94度5秒および72度6分を5回、94度5秒および70度6分を5回、94度5秒および68度6分を15回の反応でネスティッドPCRを行い、約1.1kbのバンドを得た。0.8%アガロースゲルにて分離後、該当のバンドを切りだしてQIAquickゲル抽出キット(キアゲン社、28706)にて精製し、pGEM-TベクターシステムI(プロメガ社、A3600)のマニュアルに従いTAクローニングを行った。これにより3種類のクローンを得て、HFL#5、HFL#12、HFL#6と名付けた。HFL#5、HFL#12は配列番号: 3の塩基配列の1357位から、HFL#6は配列番号: 3の塩基配列の1377位から始まり、RACEに用いたプライマー#FLNの配列までを含んでいた(図7参照)。

【0053】

塩基配列の決定は前述の方法に従い、ダイターミネーターサイクルシーケンシングFSレディーリアクションキット(Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction kit/パーキンエルマー社、Catalog #402122)を用いたサイクルシーケンス法を利用して行った。これまでに決定していた配列と新規に決定した配列を結合したものを配列番号: 3に示す。また、図3に9つのPDZドメインの配列を並べて示した。なお、サイクルシーケンス法による塩基配列の決定に用いたプライマーを表3に示す。

【0054】

【表3】

プライマー番号	DNA配列
686A	GGCATAACTTTACTTACTTG (配列番号: 63)
686B	ATCTACTAAGTCAGCATCAT (配列番号: 64)
686C	ATTTGCAGGTGTGTAGTCAT (配列番号: 65)
686D	TTCCTTCTGTGCTACCCGAT (配列番号: 66)
686E	GGACTATCTTCCAGAACATG (配列番号: 67)

【実施例 4】 「38-2-1」 遺伝子がコードするタンパク質に相同性を有するタンパク質の検索

BLASTN検索およびBLASTP検索の結果、2703bpからなる「Mus musculus 90RF binding protein 1 (9BP-1) mRNA, partial cds.」 (LOCUS: MMAF000168, ACCESSION: AF000168) が相同性のある遺伝子として検出された。この遺伝子の登録記載日は18-MAY-1997であった。「38-2-1」 遺伝子がコードするタンパク質 (配列番号: 1 に記載のアミノ酸配列の847位以降アミノ酸配列) とAF000168のアミノ酸配列を整列したものを図1に示す。なお、図中には配列番号: 1 に記載のアミノ酸配列の847位のアミノ酸を「1番目」としてそれ以降のアミノ酸配列の比較が示してある。

【0055】

また、7516bpからなる「Rattus norvegicus mRNA for multi PDZ domain protein」 (LOCUS: RNMUPP1, ACCESSION: AJ001320) および1768bp からなる「Homo sapiens mRNA for multi PDZ domain protein」 (LOCUS: HSMUPP1, ACCESSION: AJ001319) が相同性のある遺伝子として検出された。これらの遺伝子の登録記載日は26-MAR-1998であった。「32-8-1」 遺伝子がコードするタンパク質 (配列番号: 1 に記載のアミノ酸配列の921位以降のアミノ酸配列) とAJ001319のアミノ酸配列を整列したものを図2に示す。「32-8-1」 遺伝子がコードするタンパク質 (配列番号: 1 に記載のアミノ酸配列) とAJ001320のアミノ酸配列を整列したものを図3および図4に示す。

【0056】

【実施例5】ノーザンブロッティングによる発現の組織特異性の解析

クロンテックヒト組織ノーザン(MTN)プロット(Catalog #7760-1)、ヒト組織ノーザン(MTN)プロットIV(Catalog #7766-1)を用いて遺伝子発現の組織特異性を解析した。ノーザンプロットは常法にて従い、BamH I-Xba I断片(配列番号:3に記載の3709位から4337位)をプローブとして用い(プローブの位置は図7参照)、メガプライムDNAラベリングキット(アマシャム社、catalog RPN1607)を用いて25ngのDNA断片をアルファ³²P dCTPでラベルした。MTNプロットとMTNプロットIVはExpressHybハイブリダイゼーション溶液(クロンテック社、Catalog 8015-2)5mlにて68℃30分間プレハイブリダイゼーションを行い、 1×10^7 cpmのラベルされたプローブを同じくExpressHybハイブリダイゼーション溶液5ml(2×10^6 cpm/ml)にて68℃、2時間ハイブリダイズさせた。2xSSC(0.3M NaCl、0.03Mクエン酸ナトリウム(pH7.0))/0.05%SDSを用いて室温で10分3回フィルターを洗浄し、さらに0.1XSSC/0.1%SDSにて50℃で15分2回洗浄した後、FUJIイメージングプレートにて1晩感光させ、FUJI BAS2000にて解析した。図5に示すように組織としては、心臓、胎盤、骨格筋、胎児脳、胎児肺、胎児腎臓、小腸、膀胱、胃、前立腺、Hela細胞S3、肺癌A549細胞、黒色腫G361細胞で約8kbの転写物の高い発現を同定したが、肺、およびリンパ球系の組織(脾臓、胸腺)、細胞株(プロットCのレーン1、3、4、5、6)での発現は無いか低かった。心臓、肝臓、腎臓、胎児肝臓においては約5.5kbの転写物が主に発現されていた。

【0057】

また、同様に、NdeI 1.2Kb-#1プローブ(配列番号:3の1から1091位)(プローブの位置は図7参照)を用いて、ノーザンプロット解析を行った。その結果、5.5kbの転写物のバンドが検出されなかった(図6)。この事実と胎児肝臓から5'RACEによる5'末端のcDNAをクローニングしたところ心臓で発現している転写物の5'末端から1357、1377塩基下流からの配列しか含んでいなかったこと(図7)を考え合わせると、心臓と肝臓で転写開始部位が異なるために転写物の長さに相違が生じたと考えられる。したがって、肝臓から発現される32-8-1遺伝子がコードするペプチドは1396番目の塩基から始まるATGが最初のメチオニンをコードしてい

ることが予想され、心臓で発現している転写物が1373アミノ酸をコードしうのに対して、肝臓からの転写物は1005アミノ酸をコードし、PDZドメインAが含まず368アミノ酸短いと考えられる。PDZドメインAを含まないことの生物学的な意味合いは現在のところは不明であるが、PDZドメインがタンパク質-タンパク質間の相互作用に重要なドメインであることからこの部位が消失していることにより肝臓細胞で他の組織とは異なるシグナルの制御に関連している可能性が高い。

【0058】

[実施例6] 32-8-1タンパク質の大腸菌による発現

(1) 発現ベクターの構築

GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ) タンパク質との融合タンパク質として発現させるためにファルマシア社のpGEX-2TK (Genebank Accssetion U13851) に32-8-1遺伝子の一部分をGST遺伝子のカルボキシ末端に結合させた。ベクターの構築についてはPCRアプリケーションマニュアル (ベーリンガー・マイハイム社) のジ-/トリヌクレオチド スティッキーエンドクローニング法のW.Dietmaierらの方法に従った。pGEX-2TK 1 μ gを10xハイバッファー2 μ l, 20ユニットの制限酵素EcoRI, BamHIで20 μ lの反応液により37度3時間反応させた。QIAquickカラム (キアゲン社) によりマニュアルに従いタンパク質を除去精製し、30 μ lの蒸留水により溶出した。27 μ lを用いて、これに宝酒造社のクレノウ酵素に添付の10xクレノウバッファー (100mM Tris-HCl (pH7.5), 70mM MgCl₂, 1mM DTT) 3 μ lと1.5 μ lの2mM dGTPを混合し、4ユニットのクレノウ酵素を添加して室温にて15分間反応させた。75度15分の加熱処理で酵素を失活させた後、再びQIAquickカラム (キアゲン社) によりマニュアルに従いタンパク質を除去精製した。

【0059】

#32-8-1のDNA 50ngをテンプレートとしてPCR反応にて発現させる32-8-1遺伝子の1112-1373番のアミノ酸をコードする領域を増幅した。増幅反応はKOD DNAポリメラーゼ (東洋紡社) の10Xリアクションバッファー#1を5 μ l、10 μ Mのプライマー502-508 (5'-ATCGGGTCCATTCCATTTCAGAGAGG-3' (配列番号: 68))と10 μ Mのプライマー758-763E (5'-AATTGTCAAGAGAGAACCATCAAAGTGG-3' (配列番号: 69))をそれぞれ5 μ l、2.5mM dNTPを4 μ l、25mM MgCl₂を2 μ l、滅菌水27 μ lを加えて、さらに2.5 μ lのKOD

DNAポリメラーゼを混合し、94度2分後、98度15秒、65度2秒、74度30秒の反応を25サイクルで行った。QIAquick PCR精製キットを用いて、マニュアルに従い798bpのPCR産物を精製した。精製PCR断片2ulをベーリンガー社の5xT4 DNAポリメラーゼバッファー(330mM Tris-酢酸, pH8.0; 660mM 酢酸カリウム; 100mM 酢酸マグネシウム; 5mM DTT)を7ul、2mM dCTP 1.5ul,滅菌水21.5ulと混合し、T4 DNAポリメラーゼ 3ユニットを加えて、12度にて30分間反応させた。80度で15分間保温して失活させて、QIAquick PCR精製キットによりマニュアルに従い精製した。1ユニットのT4 DNAリガーゼ(プロメガ社)で添付のバッファー(30mM Tris-HCl(pH7.8), 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mM ATP)を用いてpGEX-2TKを制限酵素EcoRI, BamHIで消化し、クレノウ反応させたものとT4 DNAポリメラーゼで処理したPCR産物と15度で一晩連結反応を行い、その反応液で大腸菌DH5アルファを形質転換した。この形質転換体が発現する組み換えタンパク質をGST-PDZ56と名付けた。

【0060】

同様に、プライマー1-7(5'-ATCGATGGGTAGTAATCACACACAG-3' (配列番号: 70))とプライマー527-532E(5'-AATTGCTATACTGGATCCAGAGAGTGG-3' (配列番号: 71))でクローン32-8-1/5R3をテンプレートとして配列番号: 1のアミノ酸611番から1142番をコードするPCR産物を上述の方法によって作製し、同じ条件にてT4 DNAポリメラーゼで処理し、精製後、pGEX-2TKを制限酵素EcoRI, BamHIで消化し、クレノウ反応させたものと連結反応を行い、その反応液で大腸菌DH5アルファを形質転換した。この形質転換体が発現する組み換えタンパク質をGST-PDZ14と名付けた。

【0061】

GST-PDZ56を発現する大腸菌の形質転換体は以下の方法により選択した。得られた大腸菌の形質転換体のコロニーを4つ拾い、2ml LB培地(5gバクト-イーストエキストラクト(ディフコ社), 10gバクト-トリプトン(ディフコ社), 10g NaClを蒸留水に溶解して1Lとしたもの)に100ug/mlのアンピシリンを添加した培地で37度で一晩震とう培養し、これを100倍に同じ組成の培地に希釈して、IPTG(イソプロピルチオガラクトシド)を最終濃度0.1mMになるように添加し、37度で3時間振とう培養してそのうちの100ulを15,000回転10秒の遠心操作により沈殿させ、これ

を10%-20%SDS-ポリアクリルアミドゲルにより解析した。その結果、いずれの形質転換体についてもIPTGにより約55KdaのGST融合タンパク質が誘導発現できたことがクマシー染色により容易に検出できた(図9)。さらにウエスタンブロットによっても抗GST抗体により誘導発現された55Kdaのタンパク質のバンドが確認された(図10)。検出は10%-20%SDS-ポリアクリルアミドゲルにより分離したサンプルをミリポア社のイモビロン-PにBio-Rad社のセミドライブロッターを使って、マニュアルに記載の方法に従って、タンパク質を転写した。このフィルターを5%スキムミルク(ディフコ社製)、2.5%牛血清アルブミン(シグマ社、A5940)、T-TBS(20mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 0.05% Tween20)で4度で一晩ブロッキングし、ファルマシア社のヒツジ抗GST抗体を1000倍に抗体希釈液(1%スキムミルク、0.5%牛血清アルブミン、T-TBS)で希釈し、室温で1時間反応させた後、アルカリフォスファターゼ標識の抗ヒツジIgGを抗体希釈液で1000倍に希釈し、室温1時間反応させ、GST Detection Module(ファルマシア社)で検出した。

【0062】

GST-PDZ14についても同様に発現を行った。但し、大腸菌DH5ではIPTGによる誘導発現の効率が良くなかったため、宿主細胞としては大腸菌HB101, JM109を使用した。その結果、図11に示すように大腸菌HB101では発現産物の量はあまり多くはなかったが、大腸菌JM109において90KDa付近にGST-PDZ14由来のバンドがよく誘導されていることが判明した。以下の融合タンパク質の発現精製には大腸菌JM109を用いた。

【0063】

(2) GST融合32-8-1タンパク質の発現と精製

GST融合タンパク質の発現、精製については羊土社の実験医学別冊「新遺伝子工学ハンドブック/編集:村松正實ら」217ページに記載の融合タンパク質の作製の方法に従った。GST-PDZ14, GST-PDZ56はそれぞれ2LのLB培地で培養し、37度で1時間培養したのち、IPTGを最終濃度0.1mMになるように添加し、25度で5時間震とう培養した。7000回転で10分間にて集菌した後、PBS, 1% TritonX-100からなるソニケーションバッファーにて懸濁し、冷却しながらソニケーションを1分間ずつ5回行った。10,000回転で15分間遠心した、上清をグルタチオンセファロー

スのカラムに添付し、PBSでよく洗浄した後、GST Purification Moduleのエリューションバッファー（ファルマシアバイテク社）にて精製を行った。

【0064】

発現に使用したpGEX-2TKベクター（ファルマシア社）には32-8-1遺伝子を挿入したマルチクロニングサイトの上流にスロンビンプロテアーゼにより認識される「Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser」からなるアミノ酸をコードする領域がインフレームで挿入されているため、この配列を認識してタンパク質を消化できるプロテアーゼであるスロンビンプロテアーゼによりGSTタンパク質に部分を切り放すことができる。このことは32-8-1遺伝子がコードするタンパク質（32-8-1タンパク質）に対する抗体を作製する際には有効である。グルタチオオンセファロースカラムはGSTタンパク質と結合するため、スロンビンプロテアーゼで消化したタンパク質の溶液をグルタチオオンセファロースカラムにかけることによって、切り離されたPDZ14、PDZ56の部分のみをグルタチオオンセファロースに結合しない分画として精製することができた（図12、13、14）。図12に見られるような約55KdaのGST-PDZ56タンパク質のバンド（レーン11,12）は、スロンビンによる消化により25KdaのGSTタンパク質と約30KdaのPDZ56タンパク質に切断されており（レーン10）、また抗GST抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果、抗GST抗体は55Kda、25KdaのGSTタンパク質を含むバンドとのみ反応したため（図13）、確かにPDZ56タンパク質の部分が約30Kdaのバンドとして切り出されていることが判明した（レーン8、9）。同様にしてGST-PDZ14についてもスロンビンの消化により図14にあるように約90KdaのGST-PDZ14は、スロンビンによる消化により25KdaのGSTタンパク質と約65KdaのPDZ14タンパク質の部分とに分離することが可能であるので、以下に示す方法に従い、タンパク質の精製を行った。羊土社の実験医学別冊「新遺伝子工学ハンドブック／編集：村松正實ら」に記載の方法により大腸菌を培養し、ソニケーションをした上清を用いてスロンビンによるタンパク質の消化を行った。詳細な方法についてはGSTジーンフュージョンシステム（ファルマシア社）」16ページに記載のスロンビン切断（Thrombin Cleavage）の項に記載されている方法に従い、融合タンパク質1mgあたり10ul(10cleavage unit)のスロンビンを添加して室温で16時間保温することでGST部分とPDZ14また

はPDZ56タンパク質部分を切り離し、グルタチオンセファロースのカラム（ファルマシア社）に切断されたGSTタンパク質部分を結合させることでPDZ14 0.56mgまたはPDZ56 3.5mgのタンパク質部分をカラムの素通り分画として回収した。

【0065】

（3）大腸菌発現抗原によるポリクローナル抗体の作製

ポリクローナル抗体は、精製抗原PDZ14,PDZ56をウサギ2羽ずつに免疫することにより得られた。初回免疫は皮内にウサギ1羽あたりキャリアタンパク質の結合した0.5mgのPDZ56または0.22mgのPDZ14を常法により等量のフロインド完全アジュバント（FCA）と混和した抗原エマルジョンとして免疫し、2週間の間隔で0.25mgのPDZ56またはPDZ14を等量のフロインド不完全アジュバント（FICA）と混和した抗原エマルジョンとして皮下にさらに3回の追加免疫をおこなった。抗原に用いたタンパク質をSDS-PAGEにより分離し、PVDF膜（ミリポア社イモビロン-P）に転写後、ウエスタンブロッティングにより反応性を確認した。

【0066】

（4）ペプチドによるポリクローナル抗体の作製

21アミノ酸のペプチド32-8-1-17（配列番号：72に示す）は岩城硝子社に依頼して合成し、KLH（キーホールリンペットヘモシアニン）タンパク質をキャリアータンパク質としてSulfo-MBS法によりカップリングさせた後、2羽のウサギに免疫した。初回免疫は皮内にウサギ1羽あたりキャリアタンパク質の結合した0.4mgのペプチド32-8-1-17を常法により等量のフロインド完全アジュバント（FCA）と混和した抗原エマルジョンとして免疫し、2週間の間隔で2回目から5回目の免疫を0.2mgのキャリアタンパク質の結合したペプチド32-8-1-17を等量のフロインド不完全アジュバント（FICA）と混和した抗原エマルジョンとして皮下に免疫した。抗体価はペプチド32-8-1-17をコーティングしたELISAプレートを用いて測定し、抗体価が十分上昇したところで抗血清を得た。

【0067】

（5）ポリクローナル抗体の反応性

ペプチド32-8-1-17、並びにGST融合タンパク質として発現させた後、スロンビンで消化して32-8-1遺伝子産物のみを含むように調製したPDZ14およびPDZ56を、

それぞれウサギに免疫して得た抗血清の反応性を、クロンテック社のプロテインメドレイを用いたウェスタンブロッティングにより検出した。具体的には、クロンテック社のプロテインメドレイのうち、ヒト性巣 (Testis: T), 骨格筋 (Skeletal Muscle: Sk), 肝臓 (Liver: Lv), 心臓 (Heart: H), 脳 (Brain: B) の各組織の細胞破碎液 100ug を 10%-20% SDS-ポリアクリルアミドゲルにより分離し、ミリポア社のイモビロン-P に Bio-Rad 社のセミドライブロッターを使って、マニュアルに記載の方法に従って、タンパク質を転写した。このフィルターを 5% スキムミルク (デューコ社)、2.5% 牛血清アルブミン (シグマ社、A5940)、T-TBS (20mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 0.05% Tween20) で 4 度で一晩ブロッキングし、各ウサギ抗血清を 5000 倍に抗体希釈液 (1% スキムミルク、0.5% 牛血清アルブミン、T-TBS) で希釈し、室温で 1 時間反応させた後、ビオチン標識の抗ウサギ Ig を抗体希釈液で 1000 倍に希釈し、室温 1 時間反応させ、さらに HRP (ホースラディッシュペルオキシダーゼ) 標識のストレプトアビジン-ビオチン複合体 (アマシャム社) を 2500 倍に抗体希釈液で希釈したものと室温で 15 分反応させた後、T-TBS でよく洗浄し、アマシャム社の ECL 検出キットを用いてマニュアルに従い化学発光による反応バンドを検出した。その結果、図 15 に示すように 130Kda 付近にいずれの抗体とも反応する 32-8-1 タンパク質由来と思われるバンドが、肝臓組織のサンプルにおいて検出された。

【0068】

【発明の効果】

本発明のタンパク質および遺伝子を利用することにより、本発明のタンパク質における PDZ ドメインに結合するタンパク質およびその遺伝子を単離することが可能となった。PDZ ドメインを有するタンパク質はこれに結合するタンパク質に作用して、細胞増殖、細胞周期、癌化、アポトーシス、細胞接着等に関連したシグナル伝達において機能していることが報告されている。このため、本発明のタンパク質やこれと相互作用するタンパク質とこのようなシグナル伝達との関係が解明されれば、これらタンパク質やその遺伝子を標的として上記細胞増殖などに関連する疾患の治療が可能となると考えられ、これらタンパク質やその遺伝子は治療薬の開発などにおいて有用である。

【0069】

【配列表】

- (1) 出願人氏名又は名称：株式会社 中外分子医学研究所
- (2) 発明の名称：PDZドメイン配列を有するタンパク質
- (3) 整理番号：C2-905DP1
- (4) 出願番号：
- (5) 出願日：
- (6) 優先権のもととなった出願をした国名及び出願の番号：
日本国 平成9年特許願第230356号
- (7) 優先日：1997年8月12日
- (8) 配列の数：72

配列番号：1

配列の型：アミノ酸

配列の長さ：1373

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列の特徴

配列

Met Val

1

Cys Cys Arg Arg Thr Val Pro Pro Thr Thr Gln Ser Glu Leu Asp Ser

5

10

15

Leu Asp Leu Cys Asp Ile Glu Leu Thr Glu Lys Pro His Val Asp Leu

20

25

30

Gly Glu Phe Ile Gly Ser Ser Glu Thr Glu Asp Pro Val Leu Ala Met

35

40

45

50

Thr Asp Ala Gly Gln Ser Thr Glu Glu Val Gln Ala Pro Leu Ala Met

55

60

65

Trp Glu Ala Gly Ile Gln His Ile Glu Leu Glu Lys Gly Ser Lys Gly
 70 75 80
 Leu Gly Phe Ser Ile Leu Asp Tyr Gln Asp Pro Ile Asp Pro Ala Ser
 85 90 95
 Thr Val Ile Ile Ile Arg Ser Leu Val Pro Gly Gly Ile Ala Glu Lys
 100 105 110
 Asp Gly Arg Leu Leu Pro Gly Asp Arg Leu Met Phe Val Asn Asp Val
 115 120 125 130
 Asn Leu Glu Asn Ser Ser Leu Glu Glu Ala Val Glu Ala Leu Lys Gly
 135 140 145
 Ala Pro Ser Gly Thr Val Arg Ile Gly Val Ala Lys Pro Leu Pro Leu
 150 155 160
 Ser Pro Glu Glu Gly Tyr Val Ser Ala Lys Glu Asp Ser Phe Leu Tyr
 165 170 175
 Pro Pro His Ser Cys Glu Glu Ala Gly Leu Ala Asp Lys Pro Leu Phe
 180 185 190
 Arg Ala Asp Leu Ala Leu Val Gly Thr Asn Asp Ala Asp Leu Val Asp
 195 200 205 210
 Glu Ser Thr Phe Glu Ser Pro Tyr Ser Pro Glu Asn Asp Ser Ile Tyr
 215 220 225
 Ser Thr Gln Ala Ser Ile Leu Ser Leu His Gly Ser Ser Cys Gly Asp
 230 235 240
 Gly Leu Asn Tyr Gly Ser Ser Leu Pro Ser Ser Pro Pro Lys Asp Val
 245 250 255
 Ile Glu Asn Ser Cys Asp Pro Val Leu Asp Leu His Met Ser Leu Glu
 260 265 270
 Glu Leu Tyr Thr Gln Asn Leu Leu Glu Arg Gln Asp Glu Asn Thr Pro
 275 280 285 290
 Ser Val Asp Ile Ser Met Gly Pro Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn Asp

295	300	305
Tyr Thr Pro Ala Asn Ala Ile Glu Gln Gln Tyr Glu Cys Glu Asn Thr		
310	315	320
Ile Val Trp Thr Glu Ser His Leu Pro Ser Glu Val Ile Ser Ser Ala		
325	330	335
Glu Leu Pro Ser Val Leu Pro Asp Ser Ala Gly Lys Gly Ser Glu His		
340	345	350
Leu Leu Glu Gln Ser Ser Leu Ala Cys Asn Ala Glu Cys Val Met Leu		
355	360	365
Gln Asn Val Ser Lys Glu Ser Phe Glu Arg Thr Ile Asn Ile Ala Lys		
375	380	385
Gly Asn Ser Ser Leu Gly Met Thr Val Ser Ala Asn Lys Asp Gly Leu		
390	395	400
Gly Met Ile Val Arg Ser Ile Ile His Gly Gly Ala Ile Ser Arg Asp		
405	410	415
Gly Arg Ile Ala Ile Gly Asp Cys Ile Leu Ser Ile Asn Glu Glu Ser		
420	425	430
Thr Ile Ser Val Thr Asn Ala Gln Ala Arg Ala Met Leu Arg Arg His		
435	440	445
Ser Leu Ile Gly Pro Asp Ile Lys Ile Thr Tyr Val Pro Ala Glu His		
455	460	465
Leu Glu Glu Phe Lys Ile Ser Leu Gly Gln Gln Ser Gly Arg Val Met		
470	475	480
Ala Leu Asp Ile Phe Ser Ser Tyr Thr Gly Arg Asp Ile Pro Glu Leu		
485	490	495
Pro Glu Arg Glu Glu Gly Glu Gly Glu Glu Ser Glu Leu Gln Asn Thr		
500	505	510
Ala Tyr Ser Asn Trp Asn Gln Pro Arg Arg Val Glu Leu Trp Arg Glu		
515	520	525
		530

Pro Ser Lys Ser Leu Gly Ile Ser Ile Val Gly Gly Arg Gly Met Gly
535 540 545

Ser Arg Leu Ser Asn Gly Glu Val Met Arg Gly Ile Phe Ile Lys His
550 555 560

Val Leu Glu Asp Ser Pro Ala Gly Lys Asn Gly Thr Leu Lys Pro Gly
565 570 575

Asp Arg Ile Val Glu Ala Pro Ser Gln Ser Glu Ser Glu Pro Glu Lys
580 585 590

Ala Pro Leu Cys Ser Val Pro Pro Pro Pro Pro Ser Ala Phe Ala Glu
595 600 605 610

Met Gly Ser Asp His Thr Gln Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ser Gln Asp
615 620 625

Val Asp Lys Glu Asp Glu Phe Gly Tyr Ser Trp Lys Asn Ile Arg Glu
630 635 640

Arg Tyr Gly Thr Leu Thr Gly Glu Leu His Met Ile Glu Leu Glu Lys
645 650 655

Gly His Ser Gly Leu Gly Leu Ser Leu Ala Gly Asn Lys Asp Arg Ser
660 665 670

Arg Met Ser Val Phe Ile Val Gly Ile Asp Pro Asn Gly Ala Ala Gly
675 680 685 690

Lys Asp Gly Arg Leu Gln Ile Ala Asp Glu Leu Leu Glu Ile Asn Gly
695 700 705

Gln Ile Leu Tyr Gly Arg Ser His Gln Asn Ala Ser Ser Ile Ile Lys
710 715 720

Cys Ala Pro Ser Lys Val Lys Ile Ile Phe Ile Arg Asn Lys Asp Ala
725 730 735

Val Asn Gln Met Ala Val Cys Pro Gly Asn Ala Val Glu Pro Leu Pro
740 745 750

Ser Asn Ser Glu Asn Leu Gln Asn Lys Glu Thr Glu Pro Thr Val Thr

755	760	765	770
Thr Ser Asp Ala Ala Val	Asp Leu Ser Ser Phe Lys Asn Val	Gln His	
775	780	785	
Leu Glu Leu Pro Lys Asp Gln Gly Gly Leu Gly Ile Ala Ile Ser Glu			
790	795	800	
Glu Asp Thr Leu Ser Gly Val Ile Ile Lys Ser Leu Thr Glu His Gly			
805	810	815	
Val Ala Ala Thr Asp Gly Arg Leu Lys Val Gly Asp Gln Ile Leu Ala			
820	825	830	
Val Asp Asp Glu Ile Val Val Gly Tyr Pro Ile Glu Lys Phe Ile Ser			
835	840	845	850
Leu Leu Lys Thr Ala Lys Met Thr Val Lys Leu Thr Ile His Ala Glu			
855	860	865	
Asn Pro Asp Ser Gln Ala Val Pro Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ser Gly			
870	875	880	
Glu Lys Lys Asn Ser Ser Gln Ser Leu Met Val Pro Gln Ser Gly Ser			
885	890	895	
Pro Glu Pro Glu Ser Ile Arg Asn Thr Ser Arg Ser Ser Thr Pro Ala			
900	905	910	
Ile Phe Ala Ser Asp Pro Ala Thr Cys Pro Ile Ile Pro Gly Cys Glu			
915	920	925	930
Thr Thr Ile Glu Ile Ser Lys Gly Arg Thr Gly Leu Gly Leu Ser Ile			
935	940	945	
Val Gly Gly Ser Asp Thr Leu Leu Gly Ala Phe Ile Ile His Glu Val			
950	955	960	
Tyr Glu Glu Gly Ala Ala Cys Lys Asp Gly Arg Leu Trp Ala Gly Asp			
965	970	975	
Gln Ile Leu Glu Val Asn Gly Ile Asp Leu Arg Lys Ala Thr His Asp			
980	985	990	

Glu Ala Ile Asn Val Leu Arg Gln Thr Pro Gln Arg Val Arg Leu Thr			
995	1000	1005	1010
Leu Tyr Arg Asp Glu Ala Pro Tyr Lys Glu Glu Glu Val Cys Asp Thr			
	1015	1020	1025
Leu Thr Ile Glu Leu Gln Lys Lys Pro Gly Lys Gly Leu Gly Leu Ser			
	1030	1035	1040
Ile Val Gly Lys Arg Asn Asp Thr Gly Val Phe Val Ser Asp Ile Val			
	1045	1050	1055
Lys Gly Gly Ile Ala Asp Pro Asp Gly Arg Leu Ile Gln Gly Asp Gln			
	1060	1065	1070
Ile Leu Leu Val Asn Gly Glu Asp Val Arg Asn Ala Ser Gln Glu Ala			
1075	1080	1085	1090
Val Ala Ala Leu Leu Lys Cys Ser Leu Gly Thr Val Thr Leu Glu Val			
	1095	1100	1105
Gly Arg Ile Lys Ala Gly Pro Phe His Ser Glu Arg Arg Pro Ser Gln			
	1110	1115	1120
Thr Ser Gln Val Ser Glu Gly Ser Leu Ser Ser Phe Thr Phe Pro Leu			
	1125	1130	1135
Ser Gly Ser Ser Thr Ser Glu Ser Leu Glu Ser Ser Ser Lys Lys Asn			
	1140	1145	1150
Ala Leu Ala Ser Glu Ile Gln Gly Leu Arg Thr Val Glu Met Lys Lys			
1155	1160	1165	1170
Gly Pro Thr Asp Ser Leu Gly Ile Ser Ile Ala Gly Gly Val Gly Ser			
	1175	1180	1185
Pro Leu Gly Asp Val Pro Ile Phe Ile Ala Met Met His Pro Thr Gly			
	1190	1195	1200
Val Ala Ala Gln Thr Gln Lys Leu Arg Val Gly Asp Arg Ile Val Thr			
	1205	1210	1215
Ile Cys Gly Thr Ser Thr Glu Gly Met Thr His Thr Gln Ala Val Asn			

1220	1225	1230	
Leu Leu Lys Asn Ala Ser Gly Ser Ile Glu Met Gln Val Val Ala Gly			
1235	1240	1245	1250
Gly Asp Val Ser Val Val Thr Gly His His Gln Glu Pro Ala Ser Ser			
	1255	1260	1265
Ser Leu Ser Phe Thr Gly Leu Thr Ser Thr Ser Ile Phe Gln Asp Asp			
	1270	1275	1280
Leu Gly Pro Pro Gln Cys Lys Ser Ile Thr Leu Glu Arg Gly Pro Asp			
	1285	1290	1295
Gly Leu Gly Phe Ser Ile Val Gly Gly Tyr Gly Ser Pro His Gly Asp			
	1300	1305	1310
Leu Pro Ile Tyr Val Lys Thr Val Phe Ala Lys Gly Ala Ala Ser Glu			
1315	1320	1325	1330
Asp Gly Arg Leu Lys Arg Gly Asp Gln Ile Ile Ala Val Asn Gly Gln			
	1335	1340	1345
Ser Leu Glu Gly Val Thr His Glu Glu Ala Val Ala Ile Leu Lys Arg			
	1350	1355	1360
Thr Lys Gly Thr Val Thr Leu Met Val Leu Ser			
	1365	1370	

配列番号 : 2

配列の長さ : 1005

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配 列

Met Leu Gln Asn Val Ser Lys Glu Ser Phe Glu Arg Thr Ile Asn Ile

1

5

10

15

Ala Lys Gly Asn Ser Ser Leu Gly Met Thr Val Ser Ala Asn Lys Asp
20 25 30
Gly Leu Gly Met Ile Val Arg Ser Ile Ile His Gly Gly Ala Ile Ser
35 40 45
Arg Asp Gly Arg Ile Ala Ile Gly Asp Cys Ile Leu Ser Ile Asn Glu
50 55 60
Glu Ser Thr Ile Ser Val Thr Asn Ala Gln Ala Arg Ala Met Leu Arg
65 70 75 80
Arg His Ser Leu Ile Gly Pro Asp Ile Lys Ile Thr Tyr Val Pro Ala
85 90 95
Glu His Leu Glu Glu Phe Lys Ile Ser Leu Gly Gln Gln Ser Gly Arg
100 105 110
Val Met Ala Leu Asp Ile Phe Ser Ser Tyr Thr Gly Arg Asp Ile Pro
115 120 125
Glu Leu Pro Glu Arg Glu Glu Gly Glu Gly Glu Glu Ser Glu Leu Gln
130 135 140
Asn Thr Ala Tyr Ser Asn Trp Asn Gln Pro Arg Arg Val Glu Leu Trp
145 150 155 160
Arg Glu Pro Ser Lys Ser Leu Gly Ile Ser Ile Val Gly Gly Arg Gly
165 170 175
Met Gly Ser Arg Leu Ser Asn Gly Glu Val Met Arg Gly Ile Phe Ile
180 185 190
Lys His Val Leu Glu Asp Ser Pro Ala Gly Lys Asn Gly Thr Leu Lys
195 200 205
Pro Gly Asp Arg Ile Val Glu Ala Pro Ser Gln Ser Glu Ser Glu Pro
210 215 220
Glu Lys Ala Pro Leu Cys Ser Val Pro Pro Pro Pro Pro Ser Ala Phe
225 230 235 240
Ala Glu Met Gly Ser Asp His Thr Gln Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ser

	245	250	255
Gln Asp Val Asp Lys Glu Asp Glu Phe Gly Tyr Ser Trp Lys Asn Ile			
260	265	270	
Arg Glu Arg Tyr Gly Thr Leu Thr Gly Glu Leu His Met Ile Glu Leu			
275	280	285	
Glu Lys Gly His Ser Gly Leu Gly Leu Ser Leu Ala Gly Asn Lys Asp			
290	295	300	
Arg Ser Arg Met Ser Val Phe Ile Val Gly Ile Asp Pro Asn Gly Ala			
305	310	315	320
Ala Gly Lys Asp Gly Arg Leu Gln Ile Ala Asp Glu Leu Leu Glu Ile			
325	330	335	
Asn Gly Gln Ile Leu Tyr Gly Arg Ser His Gln Asn Ala Ser Ser Ile			
340	345	350	
Ile Lys Cys Ala Pro Ser Lys Val Lys Ile Ile Phe Ile Arg Asn Lys			
355	360	365	
Asp Ala Val Asn Gln Met Ala Val Cys Pro Gly Asn Ala Val Glu Pro			
370	375	380	
Leu Pro Ser Asn Ser Glu Asn Leu Gln Asn Lys Glu Thr Glu Pro Thr			
385	390	395	400
Val Thr Thr Ser Asp Ala Ala Val Asp Leu Ser Ser Phe Lys Asn Val			
405	410	415	
Gln His Leu Glu Leu Pro Lys Asp Gln Gly Gly Leu Gly Ile Ala Ile			
420	425	430	
Ser Glu Glu Asp Thr Leu Ser Gly Val Ile Ile Lys Ser Leu Thr Glu			
435	440	445	
His Gly Val Ala Ala Thr Asp Gly Arg Leu Lys Val Gly Asp Gln Ile			
450	455	460	
Leu Ala Val Asp Asp Glu Ile Val Val Gly Tyr Pro Ile Glu Lys Phe			
465	470	475	480

Ile Ser Leu Leu Lys Thr Ala Lys Met Thr Val Lys Leu Thr Ile His
485 490 495
Ala Glu Asn Pro Asp Ser Gln Ala Val Pro Ser Ala Ala Gly Ala Ala
500 505 510
Ser Gly Glu Lys Lys Asn Ser Ser Gln Ser Leu Met Val Pro Gln Ser
515 520 525
Gly Ser Pro Glu Pro Glu Ser Ile Arg Asn Thr Ser Arg Ser Ser Thr
530 535 540
Pro Ala Ile Phe Ala Ser Asp Pro Ala Thr Cys Pro Ile Ile Pro Gly
545 550 555 560
Cys Glu Thr Thr Ile Glu Ile Ser Lys Gly Arg Thr Gly Leu Gly Leu
565 570 575
Ser Ile Val Gly Gly Ser Asp Thr Leu Leu Gly Ala Phe Ile Ile His
580 585 590
Glu Val Tyr Glu Glu Gly Ala Ala Cys Lys Asp Gly Arg Leu Trp Ala
595 600 605
Gly Asp Gln Ile Leu Glu Val Asn Gly Ile Asp Leu Arg Lys Ala Thr
610 615 620
His Asp Glu Ala Ile Asn Val Leu Arg Gln Thr Pro Gln Arg Val Arg
625 630 635 640
Leu Thr Leu Tyr Arg Asp Glu Ala Pro Tyr Lys Glu Glu Glu Val Cys
645 650 655
Asp Thr Leu Thr Ile Glu Leu Gln Lys Lys Pro Gly Lys Gly Leu Gly
660 665 670
Leu Ser Ile Val Gly Lys Arg Asn Asp Thr Gly Val Phe Val Ser Asp
675 680 685
Ile Val Lys Gly Gly Ile Ala Asp Pro Asp Gly Arg Leu Ile Gln Gly
690 695 700
Asp Gln Ile Leu Leu Val Asn Gly Glu Asp Val Arg Asn Ala Ser Gln

705	710	715	720
Glu Ala Val Ala Ala Leu Leu Lys Cys Ser Leu Gly Thr Val Thr Leu			
725	730	735	
Glu Val Gly Arg Ile Lys Ala Gly Pro Phe His Ser Glu Arg Arg Pro			
740	745	750	
Ser Gln Thr Ser Gln Val Ser Glu Gly Ser Leu Ser Ser Phe Thr Phe			
755	760	765	
Pro Leu Ser Gly Ser Ser Thr Ser Glu Ser Leu Glu Ser Ser Ser Lys			
770	775	780	
Lys Asn Ala Leu Ala Ser Glu Ile Gln Gly Leu Arg Thr Val Glu Met			
785	790	795	800
Lys Lys Gly Pro Thr Asp Ser Leu Gly Ile Ser Ile Ala Gly Gly Val			
805	810	815	
Gly Ser Pro Leu Gly Asp Val Pro Ile Phe Ile Ala Met Met His Pro			
820	825	830	
Thr Gly Val Ala Ala Gln Thr Gln Lys Leu Arg Val Gly Asp Arg Ile			
835	840	845	
Val Thr Ile Cys Gly Thr Ser Thr Glu Gly Met Thr His Thr Gln Ala			
850	855	860	
Val Asn Leu Leu Lys Asn Ala Ser Gly Ser Ile Glu Met Gln Val Val			
865	870	875	880
Ala Gly Gly Asp Val Ser Val Val Thr Gly His His Gln Glu Pro Ala			
885	890	895	
Ser Ser Ser Leu Ser Phe Thr Gly Leu Thr Ser Thr Ser Ile Phe Gln			
900	905	910	
Asp Asp Leu Gly Pro Pro Gln Cys Lys Ser Ile Thr Leu Glu Arg Gly			
915	920	925	
Pro Asp Gly Leu Gly Phe Ser Ile Val Gly Gly Tyr Gly Ser Pro His			
930	935	940	

Gly Asp Leu Pro Ile Tyr Val Lys Thr Val Phe Ala Lys Gly Ala Ala
 945 950 955 960
 Ser Glu Asp Gly Arg Leu Lys Arg Gly Asp Gln Ile Ile Ala Val Asn
 965 970 975
 Gly Gln Ser Leu Glu Gly Val Thr His Glu Glu Ala Val Ala Ile Leu
 980 985 990
 Lys Arg Thr Lys Gly Thr Val Thr Leu Met Val Leu Ser
 995 1000 1005

配列番号 : 3

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 4880

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 292..4410

特徴を決定した方法 : E

配列

CCCGGGCCCG GGCGACAGTG GGACATCATT TTATCCGATC TGTTCCTACCA GAGGGTCCTG 60
 TTGGACACAG CGGGAAGCTC TTCAGTGGAG ACGAGCTATT GGAAAATAAG TAACGCATTC 120
 AGATGTTTAA AATCACAGAG AATACAAAGA TAAAGAATGG AAAAGGGTCT CCTTCCTGTC 180
 CCAATTCATC CAGTTCTCAT CACCCTTCAT TAGGTAAATG GCATAACTTT ACTTGGGGAA 240
 AATCACCAAG ATGTGGTGAA TATCTTAAAA GAACTGCCTA TAGAAGTGAC A ATG GTG 297

Met Val

1

TGC TGT CGT CGA ACT GTG CCA CCC ACC ACC CAA TCA GAA TTG GAT AGC 345
 Cys Cys Arg Arg Thr Val Pro Pro Thr Thr Gln Ser Glu Leu Asp Ser

5

10

15

CTG GAC TTA TGT GAT ATT GAG CTA ACA GAA AAG CCT CAC GTA GAT CTA	393
Leu Asp Leu Cys Asp Ile Glu Leu Thr Glu Lys Pro His Val Asp Leu	
20 25 30	
GGT GAG TTC ATC GGG TCA TCA GAG ACA GAG GAT CCA GTG CTG GCG ATG	441
Gly Glu Phe Ile Gly Ser Ser Glu Thr Glu Asp Pro Val Leu Ala Met	
35 40 45 50	
ACT GAT GCG GGT CAG AGT ACA GAA GAG GTT CAA GCA CCT TTG GCC ATG	489
Thr Asp Ala Gly Gln Ser Thr Glu Glu Val Gln Ala Pro Leu Ala Met	
55 60 65	
TGG GAG GCT GGC ATT CAG CAC ATA GAG CTG GAG AAA GGG AGC AAA GGA	537
Trp Glu Ala Gly Ile Gln His Ile Glu Leu Glu Lys Gly Ser Lys Gly	
70 75 80	
CTT GGT TTT AGC ATT TTA GAT TAT CAG GAT CCA ATT GAT CCA GCA AGC	585
Leu Gly Phe Ser Ile Leu Asp Tyr Gln Asp Pro Ile Asp Pro Ala Ser	
85 90 95	
ACT GTG ATT ATA ATT CGT TCT TTG GTG CCT GGC GGC ATT GCT GAA AAG	633
Thr Val Ile Ile Ile Arg Ser Leu Val Pro Gly Gly Ile Ala Glu Lys	
100 105 110	
GAT GGA CGA CTT CTT CCT GGT GAC CGA CTC ATG TTT GTA AAC GAT GTT	681
Asp Gly Arg Leu Leu Pro Gly Asp Arg Leu Met Phe Val Asn Asp Val	
115 120 125 130	
AAC TTG GAA AAC AGC AGT CTT GAG GAA GCT GTA GAA GCA CTG AAG GGA	729
Asn Leu Glu Asn Ser Ser Leu Glu Glu Ala Val Glu Ala Leu Lys Gly	
135 140 145	
GCA CCG TCA GGG ACT GTG AGA ATA GGA GTT GCT AAG CCT TTA CCC CTT	777
Ala Pro Ser Gly Thr Val Arg Ile Gly Val Ala Lys Pro Leu Pro Leu	
150 155 160	
TCA CCA GAA GAA GGT TAT GTT TCT GCT AAG GAG GAT TCC TTT CTC TAC	825
Ser Pro Glu Glu Gly Tyr Val Ser Ala Lys Glu Asp Ser Phe Leu Tyr	

165	170	175	
CCA CCA CAC TCC TGT GAG GAA GCA GGG CTG GCT GAC AAA CCC CTC TTC			873
Pro Pro His Ser Cys Glu Glu Ala Gly Leu Ala Asp Lys Pro Leu Phe			
180	185	190	
AGG GCT GAC TTG GCT CTG GTG GGC ACA AAT GAT GCT GAC TTA GTA GAT			921
Arg Ala Asp Leu Ala Leu Val Gly Thr Asn Asp Ala Asp Leu Val Asp			
195	200	205	210
GAA TCC ACA TTT GAG TCT CCA TAC TCT CCT GAA AAT GAC AGC ATC TAC			969
Glu Ser Thr Phe Glu Ser Pro Tyr Ser Pro Glu Asn Asp Ser Ile Tyr			
215	220	225	
TCT ACT CAA GCC TCT ATT TTA TCT CTT CAT GGC AGT TCT TGT GGT GAT			1017
Ser Thr Gln Ala Ser Ile Leu Ser Leu His Gly Ser Ser Cys Gly Asp			
230	235	240	
GGC CTG AAC TAT GGT TCT TCC CTT CCA TCA TCT CCT CCT AAG GAT GTT			1065
Gly Leu Asn Tyr Gly Ser Ser Leu Pro Ser Ser Pro Pro Lys Asp Val			
245	250	255	
ATT GAA AAT TCT TGT GAT CCA GTA CTT GAT CTG CAT ATG TCT CTG GAG			1113
Ile Glu Asn Ser Cys Asp Pro Val Leu Asp Leu His Met Ser Leu Glu			
260	265	270	
GAA CTA TAT ACC CAG AAT CTC CTG GAA AGA CAG GAT GAG AAT ACA CCT			1161
Glu Leu Tyr Thr Gln Asn Leu Leu Glu Arg Gln Asp Glu Asn Thr Pro			
275	280	285	290
TCG GTG GAC ATA AGT ATG GGG CCT GCT TCT GGC TTT ACT ATA AAT GAC			1209
Ser Val Asp Ile Ser Met Gly Pro Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn Asp			
295	300	305	
TAC ACA CCT GCA AAT GCT ATT GAA CAA CAA TAT GAA TGT GAA AAC ACA			1257
Tyr Thr Pro Ala Asn Ala Ile Glu Gln Gln Tyr Glu Cys Glu Asn Thr			
310	315	320	
ATA GTG TGG ACT GAA TCT CAT TTA CCA AGT GAA GTT ATA TCA AGT GCA			1305

Ile Val Trp Thr Glu Ser His Leu Pro Ser Glu Val Ile Ser Ser Ala	
325	330
GAA CTT CCT TCT GTG CTA CCC GAT TCA GCT GGA AAG GGC TCT GAG CAC	1353
Glu Leu Pro Ser Val Leu Pro Asp Ser Ala Gly Lys Gly Ser Glu His	
340	345
CTG CTT GAA CAG AGC TCC CTG GCC TGT AAT GCT GAG TGT GTC ATG CTT	1401
Leu Leu Glu Gln Ser Ser Leu Ala Cys Asn Ala Glu Cys Val Met Leu	
355	360
CAA AAT GTA TCT AAA GAA TCT TTT GAA AGG ACT ATT AAT ATA GCA AAA	1449
Gln Asn Val Ser Lys Glu Ser Phe Glu Arg Thr Ile Asn Ile Ala Lys	
375	380
GGC AAT TCT AGC CTA GGA ATG ACA GTT AGT GCT AAT AAA GAT GGC TTG	1497
Gly Asn Ser Ser Leu Gly Met Thr Val Ser Ala Asn Lys Asp Gly Leu	
390	395
GGG ATG ATC GTT CGA AGC ATT ATT CAT GGA GGT GCC ATT AGT CGA GAT	1545
Gly Met Ile Val Arg Ser Ile Ile His Gly Gly Ala Ile Ser Arg Asp	
405	410
GGC CGG ATT GCC ATT GGG GAC TGC ATC TTG TCC ATT AAT GAA GAG TCT	1593
Gly Arg Ile Ala Ile Gly Asp Cys Ile Leu Ser Ile Asn Glu Glu Ser	
420	425
ACC ATC AGT GTA ACC AAT GCC CAG GCA CGA GCT ATG TTG AGA AGA CAT	1641
Thr Ile Ser Val Thr Asn Ala Gln Ala Arg Ala Met Leu Arg Arg His	
435	440
TCT CTC ATT GGC CCT GAC ATA AAA ATT ACT TAT GTG CCT GCA GAA CAT	1689
Ser Leu Ile Gly Pro Asp Ile Lys Ile Thr Tyr Val Pro Ala Glu His	
455	460
TTG GAA GAG TTC AAA ATA AGC TTG GGA CAA CAA TCT GGA AGA GTA ATG	1737
Leu Glu Glu Phe Lys Ile Ser Leu Gly Gln Gln Ser Gly Arg Val Met	
470	480

GCA CTG GAT ATT TTT TCT TCA TAC ACT GGC AGA GAC ATT CCA GAA TTA	1785
Ala Leu Asp Ile Phe Ser Ser Tyr Thr Gly Arg Asp Ile Pro Glu Leu	
485 490 495	
CCA GAG CGA GAA GAG GGA GAG GGT GAA GAA AGC GAA CTT CAA AAC ACA	1833
Pro Glu Arg Glu Glu Gly Glu Gly Glu Glu Ser Glu Leu Gln Asn Thr	
500 505 510	
GCA TAT AGC AAT TGG AAT CAG CCC AGG CGG GTG GAA CTC TGG AGA GAA	1881
Ala Tyr Ser Asn Trp Asn Gln Pro Arg Arg Val Glu Leu Trp Arg Glu	
515 520 525 530	
CCA AGC AAA TCC TTA GGC ATC AGC ATT GTT GGT GGA CGA GGG ATG GGG	1929
Pro Ser Lys Ser Leu Gly Ile Ser Ile Val Gly Gly Arg Gly Met Gly	
535 540 545	
AGT CGG CTA AGC AAT GGA GAA GTG ATG AGG GGC ATT TTC ATC AAA CAT	1977
Ser Arg Leu Ser Asn Gly Glu Val Met Arg Gly Ile Phe Ile Lys His	
550 555 560	
GTT CTG GAA GAT AGT CCA GCT GGC AAA AAT GGA ACC TTG AAA CCT GGA	2025
Val Leu Glu Asp Ser Pro Ala Gly Lys Asn Gly Thr Leu Lys Pro Gly	
565 570 575	
GAT AGA ATC GTA GAG GCA CCC AGT CAG TCA GAG TCA GAG CCA GAG AAG	2073
Asp Arg Ile Val Glu Ala Pro Ser Gln Ser Glu Ser Glu Pro Glu Lys	
580 585 590	
GCT CCA TTG TGC AGT GTG CCC CCA CCC CCT CCT TCA GCC TTT GCC GAA	2121
Ala Pro Leu Cys Ser Val Pro Pro Pro Pro Pro Ser Ala Phe Ala Glu	
595 600 605 610	
ATG GGT AGT GAT CAC ACA CAG TCA TCT GCA AGC AAA ATC TCA CAA GAT	2169
Met Gly Ser Asp His Thr Gln Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ser Gln Asp	
615 620 625	
GTG GAC AAA GAG GAT GAG TTT GGT TAC AGC TGG AAA AAT ATC AGA GAG	2217
Val Asp Lys Glu Asp Glu Phe Gly Tyr Ser Trp Lys Asn Ile Arg Glu	

630	635	640	
CGT TAT GGA ACC CTA ACA GGC GAG CTG CAT ATG ATT GAA CTG GAG AAA			2265
Arg Tyr Gly Thr Leu Thr Gly Glu Leu His Met Ile Glu Leu Glu Lys			
645	650	655	
GGT CAT AGT GGT TTG GGC CTA AGT CTT GCT GGG AAC AAA GAC CGA TCC			2313
Gly His Ser Gly Leu Gly Leu Ser Leu Ala Gly Asn Lys Asp Arg Ser			
660	665	670	
AGG ATG AGT GTC TTC ATA GTG GGG ATT GAT CCA AAT GGA GCT GCA GGA			2361
Arg Met Ser Val Phe Ile Val Gly Ile Asp Pro Asn Gly Ala Ala Gly			
675	680	685	690
AAA GAT GGT CGA TTG CAA ATT GCA GAT GAG CTT CTA GAG ATC AAT GGT			2409
Lys Asp Gly Arg Leu Gln Ile Ala Asp Glu Leu Leu Glu Ile Asn Gly			
695	700	705	
CAG ATT TTA TAT GGA AGA AGT CAT CAG AAT GCC TCA TCA ATC ATT AAA			2457
Gln Ile Leu Tyr Gly Arg Ser His Gln Asn Ala Ser Ser Ile Ile Lys			
710	715	720	
TGT GCC CCT TCT AAA GTG AAA ATA ATT TTT ATC AGA AAT AAA GAT GCA			2505
Cys Ala Pro Ser Lys Val Lys Ile Ile Phe Ile Arg Asn Lys Asp Ala			
725	730	735	
GTG AAT CAG ATG GCC GTA TGT CCT GGA AAT GCA GTA GAA CCT TTG CCT			2553
Val Asn Gln Met Ala Val Cys Pro Gly Asn Ala Val Glu Pro Leu Pro			
740	745	750	
TCT AAC TCA GAA AAT CTT CAA AAT AAG GAG ACA GAG CCA ACT GTT ACT			2601
Ser Asn Ser Glu Asn Leu Gln Asn Lys Glu Thr Glu Pro Thr Val Thr			
755	760	765	770
ACT TCT GAT GCA GCT GTG GAC CTC AGT TCA TTT AAA AAT GTG CAA CAT			2649
Thr Ser Asp Ala Ala Val Asp Leu Ser Ser Phe Lys Asn Val Gln His			
775	780	785	
CTG GAG CTT CCC AAG GAT CAG GGG GGT TTG GGT ATT GCT ATC AGC GAA			2697

Leu Glu Leu Pro Lys Asp Gln Gly Gly Leu Gly Ile Ala Ile Ser Glu	
790	795
800	
GAA GAT ACA CTC AGT GGA GTC ATC ATA AAG AGC TTA ACA GAG CAT GGG	2745
Glu Asp Thr Leu Ser Gly Val Ile Ile Lys Ser Leu Thr Glu His Gly	
805	810
815	
GTA GCA GCC ACG GAT GGA CGA CTC AAA GTC GGA GAT CAG ATA CTG GCT	2793
Val Ala Ala Thr Asp Gly Arg Leu Lys Val Gly Asp Gln Ile Leu Ala	
820	825
830	
GTA GAT GAT GAA ATT GTT GTT GGT TAC CCT ATT GAA AAG TTT ATT AGC	2841
Val Asp Asp Glu Ile Val Val Gly Tyr Pro Ile Glu Lys Phe Ile Ser	
835	840
845	850
CTT CTG AAG ACA GCA AAG ATG ACA GTA AAA CTT ACC ATC CAT GCT GAG	2889
Leu Leu Lys Thr Ala Lys Met Thr Val Lys Leu Thr Ile His Ala Glu	
855	860
865	
AAT CCA GAT TCC CAG GCT GTT CCT TCA GCA GCT GGT GCA GCC AGT GGA	2937
Asn Pro Asp Ser Gln Ala Val Pro Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ser Gly	
870	875
880	
GAA AAA AAG AAC AGC TCC CAG TCT CTG ATG GTC CCA CAG TCT GGC TCC	2985
Glu Lys Lys Asn Ser Ser Gln Ser Leu Met Val Pro Gln Ser Gly Ser	
885	890
895	
CCA GAA CCG GAG TCC ATC CGA AAT ACA AGC AGA TCA TCA ACA CCA GCA	3033
Pro Glu Pro Glu Ser Ile Arg Asn Thr Ser Arg Ser Ser Thr Pro Ala	
900	905
910	
ATT TTT GCT TCT GAT CCT GCA ACC TGC CCC ATT ATC CCT GGC TGC GAA	3081
Ile Phe Ala Ser Asp Pro Ala Thr Cys Pro Ile Ile Pro Gly Cys Glu	
915	920
925	930
ACA ACC ATC GAG ATT TCC AAA GGG CGA ACA GGG CTG GGC CTG AGC ATC	3129
Thr Thr Ile Glu Ile Ser Lys Gly Arg Thr Gly Leu Gly Leu Ser Ile	
935	940
945	

GTT GGG GGT TCA GAC ACG CTG CTG GGT GCC TTT ATT ATC CAT GAA GTT	3177
Val Gly Gly Ser Asp Thr Leu Leu Gly Ala Phe Ile Ile His Glu Val	
950 955 960	
TAT GAA GAA GGA GCA GCA TGT AAA GAT GGA AGA CTC TGG GCT GGA GAT	3225
Tyr Glu Glu Gly Ala Ala Cys Lys Asp Gly Arg Leu Trp Ala Gly Asp	
965 970 975	
CAG ATC TTA GAG GTG AAT GGA ATT GAC TTG AGG AAG GCC ACA CAT GAT	3273
Gln Ile Leu Glu Val Asn Gly Ile Asp Leu Arg Lys Ala Thr His Asp	
980 985 990	
GAA GCA ATC AAT GTC CTG AGA CAG ACG CCA CAG AGA GTG CGC CTG ACA	3321
Glu Ala Ile Asn Val Leu Arg Gln Thr Pro Gln Arg Val Arg Leu Thr	
995 1000 1005 1010	
CTC TAC AGA GAT GAG GCC CCA TAC AAA GAG GAG GAA GTG TGT GAC ACC	3369
Leu Tyr Arg Asp Glu Ala Pro Tyr Lys Glu Glu Glu Val Cys Asp Thr	
1015 1020 1025	
CTC ACT ATT GAG CTG CAG AAG AAG CCG GGA AAA GGC CTA GGA TTA AGT	3417
Leu Thr Ile Glu Leu Gln Lys Lys Pro Gly Lys Gly Leu Gly Leu Ser	
1030 1035 1040	
ATT GTT GGT AAA AGA AAC GAT ACT GGA GTA TTT GTG TCA GAC ATT GTC	3465
Ile Val Gly Lys Arg Asn Asp Thr Gly Val Phe Val Ser Asp Ile Val	
1045 1050 1055	
AAA GGA GGA ATT GCA GAT CCC GAT GGA AGA CTG ATC CAG GGA GAC CAG	3513
Lys Gly Gly Ile Ala Asp Pro Asp Gly Arg Leu Ile Gln Gly Asp Gln	
1060 1065 1070	
ATA TTA TTG GTG AAT GGG GAA GAC GTT CGT AAT GCC TCC CAA GAA GCG	3561
Ile Leu Leu Val Asn Gly Glu Asp Val Arg Asn Ala Ser Gln Glu Ala	
1075 1080 1085 1090	
GTT GCC GCT TTG CTA AAG TGT TCC CTA GGC ACA GTA ACC TTG GAA GTT	3609
Val Ala Ala Leu Leu Lys Cys Ser Leu Gly Thr Val Thr Leu Glu Val	

1095	1100	1105	
GGA AGA ATC AAA GCT GGT CCA TTC CAT TCA GAG AGG AGG CCA TCT CAA			3657
Gly Arg Ile Lys Ala Gly Pro Phe His Ser Glu Arg Arg Pro Ser Gln			
1110	1115	1120	
ACC AGC CAG GTG AGT GAA GGC AGC CTG TCT TCT TTC ACT TTT CCA CTC			3705
Thr Ser Gln Val Ser Glu Gly Ser Leu Ser Ser Phe Thr Phe Pro Leu			
1125	1130	1135	
TCT GGA TCC AGT ACA TCT GAG TCA CTG GAA AGT AGC TCA AAG AAG AAT			3753
Ser Gly Ser Ser Thr Ser Glu Ser Leu Glu Ser Ser Ser Lys Lys Asn			
1140	1145	1150	
GCA TTG GCA TCT GAA ATA CAG GGA TTA AGA ACA GTC GAA ATG AAA AAG			3801
Ala Leu Ala Ser Glu Ile Gln Gly Leu Arg Thr Val Glu Met Lys Lys			
1155	1160	1165	1170
GGC CCT ACT GAC TCA CTG GGA ATC AGC ATC GCT GGA GGA GTA GGC AGC			3849
Gly Pro Thr Asp Ser Leu Gly Ile Ser Ile Ala Gly Gly Val Gly Ser			
1175	1180	1185	
CCA CTT GGT GAT GTG CCT ATA TTT ATT GCA ATG ATG CAC CCA ACT GGA			3897
Pro Leu Gly Asp Val Pro Ile Phe Ile Ala Met Met His Pro Thr Gly			
1190	1195	1200	
GTT GCA GCA CAG ACC CAA AAA CTC AGA GTT GGG GAT AGG ATT GTC ACC			3945
Val Ala Ala Gln Thr Gln Lys Leu Arg Val Gly Asp Arg Ile Val Thr			
1205	1210	1215	
ATC TGT GGC ACA TCC ACT GAG GGC ATG ACT CAC ACC CAA GCA GTT AAC			3993
Ile Cys Gly Thr Ser Thr Glu Gly Met Thr His Thr Gln Ala Val Asn			
1220	1225	1230	
CTA CTG AAA AAT GCA TCT GGC TCC ATT GAA ATG CAG GTG GTT GCT GGA			4041
Leu Leu Lys Asn Ala Ser Gly Ser Ile Glu Met Gln Val Val Ala Gly			
1235	1240	1245	1250
GGA GAC GTG AGT GTG GTC ACA GGT CAT CAT CAG GAG CCT GCA AGT TCC			4089

Gly Asp Val Ser Val Val Thr Gly His His Gln Glu Pro Ala Ser Ser	
1255	1260
1265	
AGT CTT TCT TTC ACT GGG CTG ACG TCA ACC AGT ATA TTT CAG GAT GAT	4137
Ser Leu Ser Phe Thr Gly Leu Thr Ser Thr Ser Ile Phe Gln Asp Asp	
1270	1275
1280	
TTA GGA CCT CCT CAA TGT AAG TCT ATT ACA CTA GAG CGA GGA CCA GAT	4185
Leu Gly Pro Pro Gln Cys Lys Ser Ile Thr Leu Glu Arg Gly Pro Asp	
1285	1290
1295	
GGC TTA GGC TTC AGT ATA GTT GGA GGA TAT GGC AGC CCT CAT GGA GAC	4233
Gly Leu Gly Phe Ser Ile Val Gly Gly Tyr Gly Ser Pro His Gly Asp	
1300	1305
1310	
TTA CCC ATT TAT GTT AAA ACA GTG TTT GCA AAG GGA GCA GCC TCT GAA	4281
Leu Pro Ile Tyr Val Lys Thr Val Phe Ala Lys Gly Ala Ala Ser Glu	
1315	1320
1325	1330
GAC GGA CGT CTG AAA AGG GGC GAT CAG ATC ATT GCT GTC AAT GGG CAG	4329
Asp Gly Arg Leu Lys Arg Gly Asp Gln Ile Ile Ala Val Asn Gly Gln	
1335	1340
1345	
AGT CTA GAA GGA GTC ACC CAT GAA GAA GCT GTT GCC ATC CTT AAA CGG	4377
Ser Leu Glu Gly Val Thr His Glu Glu Ala Val Ala Ile Leu Lys Arg	
1350	1355
1360	
ACA AAA GGC ACT GTC ACT TTG ATG GTT CTC TCT TGAATTGGCT GCCAGAATTG	4430
Thr Lys Gly Thr Val Thr Leu Met Val Leu Ser	
1365	1370
AACCAACCCA ACCCCTAGCT CACCTCCTAC TGTAAGAGA ATGCACTGGT CCTGACAATT	4490
TTTATGCTGT GTTCAGCCGG GTCTTCAAAA CTGTAGGGGG GAAATAACAC TTAAGTTTCT	4550
TTTTCTCATC TAGAAATGCT TTCCTTACTG ACAACCTAAC ATCATTTTTT TTTTCTTCTT	4610
GCATTTTGTG AACTTAAAGA GAAGGAATAT TTGTGTAGGT GAATCTCGTT TTTATTGTG	4670
GAGATATCTA ATGTTTTGTA GTCACATGGG CAAGAATTAT TACATGCTAA GCTGGTTAGT	4730
ATAAAGAAAG ATAATTCTAA AGCTAACCAA AGAAAATGGC TTCAGTAAGT TAGGATGAAA	4790

AATGAAAATA TAAATATAAG AAGAAAATCT CGGGGAGTTT AAAAAAATG CCTCAATTTG 4850
GCAATCTACC TCCTCTCCCC ACCCCAAACT

配列番号 : 4

配列の型 : アミノ酸

配列の長さ : 90

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Ala	Gly	Ile	Gln	His	Ile	Glu	Leu	Glu	Lys	Gly	Ser	Lys	Gly	Leu	Gly
1				5					10					15	
Phe	Ser	Ile	Leu	Asp	Tyr	Gln	Asp	Pro	Ile	Asp	Pro	Ala	Ser	Thr	Val
			20					25					30		
Ile	Ile	Ile	Arg	Ser	Leu	Val	Pro	Gly	Gly	Ile	Ala	Glu	Lys	Asp	Gly
		35					40					45			
Arg	Leu	Leu	Pro	Gly	Asp	Arg	Leu	Met	Phe	Val	Asn	Asp	Val	Asn	Leu
	50					55				60					
Glu	Asn	Ser	Ser	Leu	Glu	Glu	Ala	Val	Glu	Ala	Leu	Lys	Gly	Ala	Pro
65				70					75				80		
Ser	Gly	Thr	Val	Arg	Ile	Gly	Val	Ala	Lys						
			85						90						

配列番号 : 5

配列の型 : アミノ酸

配列の長さ : 91

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Gln Asn Val Ser Lys Glu Ser Phe Glu Arg Thr Ile Asn Ile Ala Lys

1	5	10	15
Gly Asn Ser Ser Leu Gly Met Thr Val Ser Ala Asn Lys Asp Gly Leu			
20	25	30	
Gly Met Ile Val Arg Ser Ile Ile His Gly Gly Ala Ile Ser Arg Asp			
35	40	45	
Gly Arg Ile Ala Ile Gly Asp Cys Ile Leu Ser Ile Asn Glu Glu Ser			
50	55	60	
Thr Ile Ser Val Thr Asn Ala Gln Ala Arg Ala Met Leu Arg Arg His			
65	70	75	80
Ser Leu Ile Gly Pro Asp Ile Lys Ile Thr Tyr			
85	90		

配列番号 : 6

配列の型 : アミノ酸

配列の長さ : 96

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Asn Gln Pro Arg Arg Val Glu Leu Trp Arg Glu Pro Ser Lys Ser Leu			
1	5	10	15
Gly Ile Ser Ile Val Gly Gly Arg Gly Met Gly Ser Arg Leu Ser Asn			
20	25	30	
Gly Glu Val Met Arg Gly Ile Phe Ile Lys His Val Leu Glu Asp Ser			
35	40	45	
Pro Ala Gly Lys Asn Gly Thr Leu Lys Pro Gly Asp Arg Ile Val Glu			
50	55	60	
Ala Pro Ser Gln Ser Glu Ser Glu Pro Glu Lys Ala Pro Leu Cys Ser			
65	70	75	80
Val Pro Pro Pro Pro Pro Ser Ala Phe Ala Glu Met Gly Ser Asp His			

85

90

95

配列番号 : 7

配列の型 : アミノ酸

配列の長さ : 86

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Gly Glu Leu His Met Ile Glu Leu Glu Lys Gly His Ser Gly Leu Gly

1 5 10 15

Leu Ser Leu Ala Gly Asn Lys Asp Arg Ser Arg Met Ser Val Phe Ile

20 25 30

Val Gly Ile Asp Pro Asn Gly Ala Ala Gly Lys Asp Gly Arg Leu Gln

35 40 45

Ile Ala Asp Glu Leu Leu Glu Ile Asn Gly Gln Ile Leu Tyr Gly Arg

50 55 60

Ser His Gln Asn Ala Ser Ser Ile Ile Lys Cys Ala Pro Ser Lys Val

65 70 75 80

Lys Ile Ile Phe Ile Arg

85

配列番号 : 8

配列の型 : アミノ酸

配列の長さ : 84

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Lys Asn Val Gln His Leu Glu Leu Pro Lys Asp Gln Gly Gly Leu Gly

1 5 10 15

Ile Ala Ile Ser Glu Glu Asp Thr Leu Ser Gly Val Ile Ile Lys Ser
 20 25 30
 Leu Thr Glu His Gly Val Ala Ala Thr Asp Gly Arg Leu Lys Val Gly
 35 40 45
 Asp Gln Ile Leu Ala Val Asp Asp Glu Ile Val Val Gly Tyr Pro Ile
 50 55 60
 Glu Lys Phe Ile Ser Leu Leu Lys Thr Ala Lys Met Thr Val Lys Leu
 65 70 75 80
 Thr Ile His Ala

配列番号：9

配列の型：アミノ酸

配列の長さ：86

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Gly Cys Glu Thr Thr Ile Glu Ile Ser Lys Gly Arg Thr Gly Leu Gly
 1 5 10 15
 Leu Ser Ile Val Gly Gly Ser Asp Thr Leu Leu Gly Ala Phe Ile Ile
 20 25 30
 His Glu Val Tyr Glu Glu Gly Ala Ala Cys Lys Asp Gly Arg Leu Trp
 35 40 45
 Ala Gly Asp Gln Ile Leu Glu Val Asn Gly Ile Asp Leu Arg Lys Ala
 50 55 60
 Thr His Asp Glu Ala Ile Asn Val Leu Arg Gln Thr Pro Gln Arg Val
 65 70 75 80
 Arg Leu Thr Leu Tyr Arg
 85

配列番号 : 10

配列の型 : アミノ酸

配列の長さ : 85

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Cys	Asp	Thr	Leu	Thr	Ile	Glu	Leu	Gln	Lys	Lys	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
1				5					10					15	
Gly	Leu	Ser	Ile	Val	Gly	Lys	Arg	Asn	Asp	Thr	Gly	Val	Phe	Val	Ser
				20				25					30		
Asp	Ile	Val	Lys	Gly	Gly	Ile	Ala	Asp	Pro	Asp	Gly	Arg	Leu	Ile	Gln
			35				40					45			
Gly	Asp	Gln	Ile	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Glu	Asp	Val	Arg	Asn	Ala	Ser
		50				55					60				
Gln	Glu	Ala	Val	Ala	Ala	Leu	Leu	Lys	Cys	Ser	Leu	Gly	Thr	Val	Thr
	65					70				75				80	
Leu	Glu	Val	Gly	Arg											
															85

配列番号 : 11

配列の型 : アミノ酸

配列の長さ : 89

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Gln	Gly	Leu	Arg	Thr	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Gly	Pro	Thr	Asp	Ser	Leu
1				5					10					15	
Gly	Ile	Ser	Ile	Ala	Gly	Gly	Val	Gly	Ser	Pro	Leu	Gly	Asp	Val	Pro

配列番号 : 13

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 184

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列の特徴

配列

GCTATTTTGA AAATATATTT ATATCTACGA AAAGAATTGG GAAAACAAAT ATTTAATCAG	60
AGAATTATTC CTTAAAGATT TAAAATGTAT TTAGTTGTAC ATTTTATATG GGTTCAACCCC	120
AGCACATGAA GTATAATGGT CAGATTTATT TNGTATTTAT TTACTATTAT AACCACTTTT	180
TAGG	184

配列番号 : 14

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CTCCCCATCC CTCGTCCACC	20
-----------------------	----

配列番号 : 15

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CTCTGACTCT GACTGACTGG	20
-----------------------	----

配列番号 : 16

配列の型 : 核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATGAGTTTGG TTACAGCTGG

20

配列番号：17

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCAGAGAGCG TTATGGAACC

20

配列番号：18

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGTCTTGCTG GGAACAAAGA

20

配列番号：19

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ACTGTTACTA CTTCTGATGC

20

配列番号：20

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCTGATGGTC CCACAGTCTG

20

配列番号：21

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTTGTTTCGC AGCCAGGGAT

20

配列番号：22

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTGAGCATCG TTGGGGGTTC

20

配列番号：23

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCTCATCTCT GTAGAGTGTC

20

配列番号：24

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TGTTAGCCCC CTCACTAAGG

20

配列番号：25

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCTATGTGCT AGGAAATACG

20

配列番号：26

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TAGGGAGAAG GATCAGAGCG

20

配列番号：27

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ACAGATTCT GACTCACTGG

20

配列番号：28

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TGGAAATAGG CATTCTTCAG 20

配列番号 : 29

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

ATACAAAGAC GGTCTAATCC 20

配列番号 : 30

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 21

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CCGCTTTCCC ATCTTTAGAAA C 21

配列番号 : 31

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TATCTCGTGT GGAAGATGTG 20

配列番号 : 32

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

ACATAAATGT TGCTATCACC 20

配列番号 : 33

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TGCCACTTAG TAGCCGAGTG 20

配列番号 : 34

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GCATTGCATT ACAGTTGAGC 20

配列番号 : 35

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TCCTCCTTTG ACAATGTCTG 20

配列番号 : 36

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CATTTGACT GTTCTTAATC 20

配列番号 : 37

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TCAGTGGATG TGCCACAGAT 20

配列番号 : 38

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CAGTAGGTTA ACTGCTTCGG 20

配列番号 : 39

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

AGTTCCAGTC TTTCTTTCGG 20

配列番号 : 40

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 21

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TTTCTTTCAC TGGGCTGAAGT C 21

配列番号 : 41

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CCTCTGAAGA CGGACGTCTG

20

配列番号 : 42

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 27

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CCATCCTAAT ACGACTCACT ATAGGGC

27

配列番号 : 43

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 27

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TTGGGGTGGG GAGAGGAGGT AGATTGC

27

配列番号 : 44

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 23

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

ACTCACTATA GGGCTCGAGC GGC

23

配列番号 : 45

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 27

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GCACATCACC AAGTGGGCTG CCTACTC 27

配列番号 : 46

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

ATGAGTTTGG TTACAGCTGG 20

配列番号 : 47

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

AATCTAATGC AGCTCGCCTG 20

配列番号 : 48

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

AGTCTTGCTG GGAACAAAGA 20

配列番号 : 49

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCACCTTAGA AGGGGCACAT

20

配列番号：50

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ACTGTTACTA CTTCTGATGC

20

配列番号：51

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCTGATGGTC CCACAGTCTG

20

配列番号：52

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTTGTTTCGC AGCCAGGGAT

20

配列番号：53

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTGAGCATCG TTGGGGGTTT

20

配列番号：54

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCTCATCTCT GTAGAGTGTC

20

配列番号：55

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TAGGGAGAAG GATCAGAGCG

20

配列番号：56

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCCTCCTTTG ACAATGTCTG

20

配列番号：57

配列の型：核酸

配列の長さ : 18

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TTTCATCATC TACAGCCAGT

20

配列番号 : 58

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TGACACCCTC ACTATTGAGC

20

配列番号 : 59

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 2819

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 43..2331

特徴を決定した方法 : E

配列

ACCACCGCCT CCGCGGCACC CCCTCCTTCA GCCTTTGCCG AA ATG GGT AGT AAT

54

Met Gly Ser Asn

1

CAC ACA CAG TCA TCT GCA AGC AAA ATC TCA CAA GAT GTG GAC AAA GAG

102

His Thr Gln Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ser Gln Asp Val Asp Lys Glu

5

10

15

20

GAT GAG TTT GGT TAC AGC TGG AAA AAT ATC AGA GAG CGT TAT GGA ACC	150
Asp Glu Phe Gly Tyr Ser Trp Lys Asn Ile Arg Glu Arg Tyr Gly Thr	
25 30 35	
CTA ACA GGC GAG CTG CAT ATG ATT GAA CTG GAG AAA GGT CAT AGT GGT	198
Leu Thr Gly Glu Leu His Met Ile Glu Leu Glu Lys Gly His Ser Gly	
40 45 50	
TTG GGC CTA AGT CTT GCT GGG AAC AAA GAC CGA TCC AGG ATG AGT GTC	246
Leu Gly Leu Ser Leu Ala Gly Asn Lys Asp Arg Ser Arg Met Ser Val	
55 60 65	
TTC ATA GTG GGG ATT GAT CCA AAT GGA GCT GCA GGA AAA GAT GGT CGA	294
Phe Ile Val Gly Ile Asp Pro Asn Gly Ala Ala Gly Lys Asp Gly Arg	
70 75 80	
TTG CAA ATT GCA GAT GAG CTT CTA GAG ATC AAT GGT CAG ATT TTA TAT	342
Leu Gln Ile Ala Asp Glu Leu Leu Glu Ile Asn Gly Gln Ile Leu Tyr	
85 90 95 100	
GGA AGA AGT CAT CAG AAT GCC TCA TCA ATC ATT AAA TGT GCC CCT TCT	390
Gly Arg Ser His Gln Asn Ala Ser Ser Ile Ile Lys Cys Ala Pro Ser	
105 110 115	
AAA GTG AAA ATA ATT TTT ATC AGA AAT AAA GAT GCA GTG AAT CAG ATG	438
Lys Val Lys Ile Ile Phe Ile Arg Asn Lys Asp Ala Val Asn Gln Met	
120 125 130	
GCC GTA TGT CCT GGA AAT GCA GTA GAA CCT TTG CCT TCT AAC TCA GAA	486
Ala Val Cys Pro Gly Asn Ala Val Glu Pro Leu Pro Ser Asn Ser Glu	
135 140 145	
AAT CTT CAA AAT AAG GAG CCA GAG CCA ACT GTT ACT ACT TCT GAT GCA	534
Asn Leu Gln Asn Lys Glu Pro Glu Pro Thr Val Thr Thr Ser Asp Ala	
150 155 160	
GCT GTG GAC CTC AGT TCA TTT AAA AAT GTG CAA CAT CTG GAG CTT CCC	582
Ala Val Asp Leu Ser Ser Phe Lys Asn Val Gln His Leu Glu Leu Pro	

165	170	175	180	
AAG GAT CAG GGG GGT TTG GGT ATT GCT ATC AGC GAA GAA GAT ACA CTC				630
Lys Asp Gln Gly Gly Leu Gly Ile Ala Ile Ser Glu Glu Asp Thr Leu				
	185	190	195	
AGT GGA GTC ATC ATA AAG AGC TTA ACA GAG CAT GGG GTA GCA GCC ACG				678
Ser Gly Val Ile Ile Lys Ser Leu Thr Glu His Gly Val Ala Ala Thr				
	200	205	210	
GAT GGA CGA CTC AAA GTC GGA GAT CAG ATA CTG GCT GTA GAT GAT GAA				726
Asp Gly Arg Leu Lys Val Gly Asp Gln Ile Leu Ala Val Asp Asp Glu				
	215	220	225	
ATT GTT GTT GGT TAC CCT ATT GAA AAG TTT ATT AGC CTT CTG AAG ACA				774
Ile Val Val Gly Tyr Pro Ile Glu Lys Phe Ile Ser Leu Leu Lys Thr				
	230	235	240	
GCA AAG ATG ACA GTA AAA CTT ACC ATC CAT GCT GAG AAT CCA GAT TCC				822
Ala Lys Met Thr Val Lys Leu Thr Ile His Ala Glu Asn Pro Asp Ser				
	245	250	255	260
CAG GCT GTT CCT TCA GCA GCT GGT GCA GCC AGT GGA GAA AAA AAG AAC				870
Gln Ala Val Pro Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ser Gly Glu Lys Lys Asn				
	265	270	275	
AGC TCC CAG TCT CTG ATG GTC CCA CAG TCT GGC TCC CCA GAA CCG GAG				918
Ser Ser Gln Ser Leu Met Val Pro Gln Ser Gly Ser Pro Glu Pro Glu				
	280	285	290	
TCC ATC CGA AAT ACA AGC AGA TCA TCA ACA CCA GCA ATT TTT GCT TCT				966
Ser Ile Arg Asn Thr Ser Arg Ser Ser Thr Pro Ala Ile Phe Ala Ser				
	295	300	305	
GAT CCT GCA ACC TGC CCC ATT ATC CCT GGC TGC GAA ACA ACC ATC GAG				1014
Asp Pro Ala Thr Cys Pro Ile Ile Pro Gly Cys Glu Thr Thr Ile Glu				
	310	315	320	
ATT TCC AAA GGG CGA ACA GGG CTG GGC CTG AGC ATC GTT GGG GGT TCA				1062

Ile Ser Lys Gly Arg Thr Gly Leu Gly Leu Ser Ile Val Gly Gly Ser			
325	330	335	340
GAC ACG CTG CTG GGT GCC TTT ATT ATC CAT GAA GTT TAT GAA GAA GGA	1110		
Asp Thr Leu Leu Gly Ala Phe Ile Ile His Glu Val Tyr Glu Glu Gly			
345	350	355	
GCA GCA TGT AAA GAT GGA AGA CTC TGG GCT GGA GAT CAG ATC TTA GAG	1158		
Ala Ala Cys Lys Asp Gly Arg Leu Trp Ala Gly Asp Gln Ile Leu Glu			
360	365	370	
GTG AAT GGA ATT GAC TTG AGG AAG GCC ACA CAT GAT GAA GCA ATC AAT	1206		
Val Asn Gly Ile Asp Leu Arg Lys Ala Thr His Asp Glu Ala Ile Asn			
375	380	385	
GTC CTG AGA CAG ACG CCA CAG AGA GTG CGC CTG ACA CTC TAC AGA GAT	1254		
Val Leu Arg Gln Thr Pro Gln Arg Val Arg Leu Thr Leu Tyr Arg Asp			
390	395	400	
GAG GCC CCA TAC AAA GAG GAG GAA GTG TGT GAC ACC CTC ACT ATT GAG	1302		
Glu Ala Pro Tyr Lys Glu Glu Glu Val Cys Asp Thr Leu Thr Ile Glu			
405	410	415	420
CTG CAG AAG AAG CCG GGA AAA GGC CTA GGA TTA AGT ATT GTT GGT AAA	1350		
Leu Gln Lys Lys Pro Gly Lys Gly Leu Gly Leu Ser Ile Val Gly Lys			
425	430	435	
AGA AAC GAT ACT GGA GTA TTT GTG TCA GAC ATT GTC AAA GGA GGA ATT	1398		
Arg Asn Asp Thr Gly Val Phe Val Ser Asp Ile Val Lys Gly Gly Ile			
440	445	450	
GCA GAT CCC GAT GGA AGA CTG ATC CAG GGA GAC CAG ATA TTA TTG GTG	1446		
Ala Asp Pro Asp Gly Arg Leu Ile Gln Gly Asp Gln Ile Leu Leu Val			
455	460	465	
AAT GGG GAA GAC GTT CGT AAT GCC TCC CAA GAA GCG GTT GCC GCT TTG	1494		
Asn Gly Glu Asp Val Arg Asn Ala Ser Gln Glu Ala Val Ala Ala Leu			
470	475	480	

CTA	AAG	TGT	TCC	CTA	GGC	ACA	GTA	ACC	TTG	GAA	GTT	GGA	AGA	ATC	AAA	1542
Leu	Lys	Cys	Ser	Leu	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Glu	Val	Gly	Arg	Ile	Lys	
485					490					495					500	
GCT	GGT	CCA	TTC	CAT	TCA	GAG	AGG	AGG	CCA	TCT	CAA	ACC	AGC	CAG	GTG	1590
Ala	Gly	Pro	Phe	His	Ser	Glu	Arg	Arg	Pro	Ser	Gln	Thr	Ser	Gln	Val	
				505					510					515		
AGT	GAA	GGC	AGC	CTG	TCT	TCT	TTC	ACT	TTT	CCA	CTC	TCT	GGA	TCC	AGT	1638
Ser	Glu	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Phe	Thr	Phe	Pro	Leu	Ser	Gly	Ser	Ser	
			520					525					530			
ACA	TCT	GAG	TCA	CTG	GAA	AGT	AGC	TCA	AAG	AAG	AAT	GCA	TTG	GCA	TCT	1686
Thr	Ser	Glu	Ser	Leu	Glu	Ser	Ser	Ser	Lys	Lys	Asn	Ala	Leu	Ala	Ser	
			535					540					545			
GAA	ATA	CAG	GGA	TTA	AGA	ACA	GTC	GAA	ATG	AAA	AAG	GGC	CCT	ACT	GAC	1734
Glu	Ile	Gln	Gly	Leu	Arg	Thr	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Gly	Pro	Thr	Asp	
	550					555				560						
TCA	CTG	GGA	ATC	AGC	ATC	GCT	GGA	GGA	GTA	GGC	AGC	CCA	CTT	GGT	GAT	1782
Ser	Leu	Gly	Ile	Ser	Ile	Ala	Gly	Gly	Val	Gly	Ser	Pro	Leu	Gly	Asp	
565					570					575					580	
GTG	CCT	ATA	TTT	ATT	GCA	ATG	ATG	CAC	CCA	ACT	GGA	GTT	GCA	GCA	CAG	1830
Val	Pro	Ile	Phe	Ile	Ala	Met	Met	His	Pro	Thr	Gly	Val	Ala	Ala	Gln	
				585					590					595		
ACC	CAA	AAA	CTC	AGA	GTT	GGG	GAT	AGG	ATT	GTC	ACC	ATC	TGT	GGC	ACA	1878
Thr	Gln	Lys	Leu	Arg	Val	Gly	Asp	Arg	Ile	Val	Thr	Ile	Cys	Gly	Thr	
			600						605				610			
TCC	ACT	GAG	GGC	ATG	ACT	CAC	ACC	CAA	GCA	GTT	AAC	CTA	CTG	AAA	AAT	1926
Ser	Thr	Glu	Gly	Met	Thr	His	Thr	Gln	Ala	Val	Asn	Leu	Leu	Lys	Asn	
			615					620					625			
GCA	TCT	GGC	TCC	ATT	GAA	ATG	CAG	GTG	GTT	GCT	GGA	GGA	GAC	GTG	AGT	1974
Ala	Ser	Gly	Ser	Ile	Glu	Met	Gln	Val	Val	Ala	Gly	Gly	Asp	Val	Ser	

630	635	640	
GTG GTC ACA GGT CAT CAT CAG GAG CCT GCA AGT TCC AGT CTT TCT TTC			2022
Val Val Thr Gly His His Gln Glu Pro Ala Ser Ser Ser Leu Ser Phe			
645	650	655	660
ACT GGG CTG ACG TCA ACC AGT ATA TTT CAG GAT GAT TTA GGA CCT CCT			2070
Thr Gly Leu Thr Ser Thr Ser Ile Phe Gln Asp Asp Leu Gly Pro Pro			
665	670	675	
CAA TGT AAG TCT ATT ACA CTA GAG CGA GGA CCA GAT GGC TTA GGC TTC			2118
Gln Cys Lys Ser Ile Thr Leu Glu Arg Gly Pro Asp Gly Leu Gly Phe			
680	685	690	
AGT ATA GTT GGA GGA TAT GGC AGC CCT CAT GGA GAC TTA CCC ATT TAT			2166
Ser Ile Val Gly Gly Tyr Gly Ser Pro His Gly Asp Leu Pro Ile Tyr			
695	700	705	
GTT AAA ACA GTG TTT GCA AAG GGA GCA GCC TCT GAA GAC GGA CGT CTG			2214
Val Lys Thr Val Phe Ala Lys Gly Ala Ala Ser Glu Asp Gly Arg Leu			
710	715	720	
AAA AGG GGC GAT CAG ATC ATT GCT GTC AAT GGG CAG AGT CTA GAA GGA			2262
Lys Arg Gly Asp Gln Ile Ile Ala Val Asn Gly Gln Ser Leu Glu Gly			
725	730	735	740
GTC ACC CAT GAA GAA GCT GTT GCC ATC CTT AAA CGG ACA AAA GGC ACT			2310
Val Thr His Glu Glu Ala Val Ala Ile Leu Lys Arg Thr Lys Gly Thr			
745	750	755	
GTC ACT TTG ATG GTT CTC TCT TGAATTGGCT GCCAGAATTG AACCAACCCA			2361
Val Thr Leu Met Val Leu Ser			
760			
ACCCCTAGCT CACCTCCTAC TGTAAGAGA ATGCACTGGT CCTGACAATT TTTATGCTGT			2421
GTTCAGCCGG GTCTTCAAAA CTGTAGGGGG GAAATAACAC TTAAGTTTCT TTTTCTCATC			2481
TAGAAATGCT TTCCTTACTG ACAACCTAAC ATCATTTTTT TTTTCTTCTT GCATTTTGTG			2541
AACTTAAAGA GAAGGAATAT TTGTGTAGGT GAATCTCGTT TTTATTTGTG GAGATATCTA			2601

ATGTTTTGTA GTCACATGGG CAAGAATTAT TACATGCTAA GCTGGTTAGT ATAAAGAAAAG 2661
 ATAATTCTAA AGCTAACCAA AGAAAATGGC TTCAGTAAGT TAGGATGAAA AATGAAAATA 2721
 TAAAATAAAG AAGAAAATCT CGGGGAGTTT AAAAAAATG CCTCAATTTG GCAATCTACC 2781
 TCCTCTCCCC ACCCCAAACT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 2819

配列番号 : 60

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 25

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GCCCTTAGGA CGCGTAATAC GACTC 25

配列番号 : 61

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 25

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

AGCCAGTATC TGATCTCCGA CTTTG 25

配列番号 : 62

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 25

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

ATTTTCACTT TAGAAGGGGC ACAT 25

配列番号 : 63

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGCATAACTT TACTTACTTG

20

配列番号：64

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATCTACTAAG TCAGCATCAT

20

配列番号：65

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATTTGCAGGT GTGTAGTCAT

20

配列番号：66

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTCCTTCTGT GCTACCCGAT

20

配列番号：67

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGACTATCTT CCAGAACATG

20

配列番号：68

配列の型：核酸

配列の長さ：25

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATCGGGTCCA TTCCATTCAG AGAGG

25

配列番号：69

配列の型：核酸

配列の長さ：28

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AATTGTCAAG AGAGAACCAT CAAAGTGG

28

配列番号：70

配列の型：核酸

配列の長さ：25

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATCGATGGGT AGTAATCACA CACAG

25

配列番号：71

配列の型：核酸

配列の長さ：27

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AATTGCTATA CTGGATCCAG AGAGTGG

27

配列番号 : 72

配列の型 : アミノ酸

配列の長さ : 21

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Val Asp Lys Glu Asp Glu Phe Gly Tyr Ser Trp Lys Asn Ile Arg Glu

1

5

10

15

Arg Tyr Gly Cys Gly

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】

「32-8-1」と「AF00168」の配列の比較を示す図である。

【図 2】

「32-8-1」と「AJ001319」の配列の比較を示す図である。

【図 3】

「32-8-1」と「AJ001320」の配列の比較を示す図である。

【図 4】

「32-8-1」と「AJ001320」の配列の比較を示す図 3 の続きの図である。

【図 5】

「32-8-1遺伝子」のノーザンブロット解析の結果を示す電気泳動写真である。
 プローブとしてBamH I-Xba I断片を用いた。図中の「H」はHuman Multiple Tissue Northern (MTN) Blot (クロンテック #7760-1) を用いて検出したもので、1. 心臓、2. 脳、3. 胎盤、4. 肺、5. 肝臓、6. 骨格筋、7. 腎臓、8. すい臓を示す。
 「H4」はHuman Multiple Tissue Northern (MTN) Blot IV (クロンテック #7766-1) を用いて検出したもので、1. 脾臓、2. 胸腺、3. 前立腺、4. 精巣、5. 子宮、6. 小腸、7. 大腸、8. 末梢リンパ球を示す。「F2」はHuman Fetal Multipl

e Tissue Northern (MTN) Blot II (クロンテック #7756-1)を用いて検出したもので、1. 胎児脳、2. 胎児肺、3. 胎児肝臓、4. 胎児腎臓を示す。

【図 6】

「32-8-1遺伝子」のノーザンブロット解析の結果を示す電気泳動写真である。NdeI 1.2Kb-#1プローブを用いた。図中の「H」はHuman Multiple Tissue Northern (MTN) Blot (クロンテック #7760-1)を用いて検出したもので、1. 心臓、2. 脳、3. 胎盤、4. 肺、5. 肝臓、6. 骨格筋、7. 腎臓、8. すい臓を示す。「H4」はHuman Multiple Tissue Northern (MTN) Blot IV (クロンテック #7766-1)を用いて検出したもので、1. 脾臓、2. 胸腺、3. 前立腺、4. 精巣、5. 子宮、6. 小腸、7. 大腸、8. 末梢リンパ球を示す。「F2」はHuman Fetal Multiple Tissue Northern (MTN) Blot II (クロンテック #7756-1)を用いて検出したもので、1. 胎児脳、2. 胎児肺、3. 胎児肝臓、4. 胎児腎臓を示す。「Mu」はHuman Muscle Multiple Tissue Northern (MTN) Blot (クロンテック #7765-1)を用いて検出したもので、1. 骨格筋、2. 子宮、3. 大腸、4. 小腸、5. 膀胱、6. 心臓、7. 胃、8. 前立腺を示す。「C」はHuman Cancer Cell Line Multiple Tissue Northern (MTN) Blot (クロンテック #7757-1)を用いて検出したもので、1. 急性白血病 HL-60細胞、2. HeLa細胞S3、3. 慢性骨髄性白血病 K-562細胞、4. リンパ芽球性白血病 MOLT-4細胞、5. バーキットリンフォーマ Raji細胞、6. 大腸腺癌SW480細胞、7. 肺癌A549細胞、8. 黒色腫G361細胞をそれぞれ示す。

【図 7】

本発明者らが単離した「32-8-1」cDNAクローン、心臓cDNA由来の「686-1-2」クローンおよび「686-1-4」クローン、並びに胎児肝臓cDNA由来の「FL#5」、「#12」、および「#6」クローンの間の位置関係を示す。32-8-1遺伝子がコードしているPDZドメインの位置は円形で示した。翻訳開始点は配列番号292、翻訳の停止点の配列番号4410も図中に示した。プローブNdeI 1.2Kb-#1, BamHI-XbaIの位置も合わせて示した。

【図 8】

32-8-1遺伝子がコードするタンパク質（配列番号：1）のPDZドメインの配列を示す。32-8-1遺伝子のコードするタンパク質内に存在するPDZドメインの配列

を並べて示した。

【図 9】

GST-PDZ56を発現する大腸菌の形質転換体のコロニーを4つ拾い、IPTG(イソプロピルチオガラクトシド)の誘導の有無で発現を比較した。コントロールとしてpGST-2TKの形質転換体を用いた。偶数の番号のレーンは、IPTGによる誘導の前、奇数の番号はIPTGの誘導後3時間を経過した、それぞれのクローンのサンプルを10%-20%SDS-ポリアクリルアミドゲルにより解析した。レーン2、3はpGST-2TKの形質転換体を、レーン5から11はGST-PDZ56を発現する大腸菌の形質転換体クローン1から4を示す。そのレーン1は分子量マーカを示す。

【図 10】

図6に示したものと同一サンプルをウエスタンブロットによって解析した。抗GST抗体により誘導発現された55Kdaのタンパク質のバンドが確認された(矢印)。IPTGの誘導後3時間のサンプルにおいて30Kda付近に見られるバンドはGST-PDZ56タンパク質が分解したものと考えられる。

【図 11】

大腸菌形質転換体のIPTGの誘導後3時間でのGST-PDZ14の発現をクマシーブルー染色により解析した。レーン2、7はIPTGによる誘導前のサンプルで、レーン3から6は大腸菌HB101の形質転換体クローン1、2、3、4を、レーン8から11は大腸菌JM109の形質転換体クローン1、2、3、4をIPTGの誘導によってGST-PDZ14の発現させた結果を示す。レーン1は分子量マーカを示す。

【図 12】

PDZ56の精製過程を示す。クマシーブルー染色をおこなった。レーン1は分子量マーカを示す。レーン2は培養液、レーン3は超音波破碎後のサンプル、レーン4はグルタチオンセファロースカラムに結合しなかった画分、レーン5から7は洗浄液、レーン8、9はスロンピンで消化してグルタチオンセファロースカラムから遊離してきたGSTタンパク質部分を含まないPDZ56タンパク質を示す。約30Kdaのバンドがはっきりと検出できる。レーン10はスロンピンで消化後、グルタチオンセファロースカラムに結合しているGSTタンパク質部分を溶出したもの。レーン11、12はスロンピンで消化しないでグルタチオンを含む通常の溶出液により溶

出されたGST-PDZ56融合タンパク質を示す。

【図 13】

図9と同じサンプルをブロッティングしたフィルターを抗GST抗体にて検出したウエスタンブロッティングの結果を示す。レーン11、12に見られる約55KdaのGST-PDZ56融合タンパク質はスロンビンによる消化でGST部分を含まないPDZ56のみに切断されていることがレーン8、9とレーン10を比較することで明らかである。

【図 14】

図9と同様にPDZ14の精製過程を示す。レーン1は分子量マーカを示す。レーン2は培養液、レーン3は超音波破碎後のサンプル、レーン4はグルタチオンセファロースカラムに結合しなかった画分、レーン5から8は洗浄液、レーン9、10、11はスロンビンで消化してグルタチオンセファロースカラムから遊離してきたGSTタンパク質部分を含まないPDZ14タンパク質を示す。約65Kdaのバンドがはっきりと検出できる。しかしながら、28Kdaと37KdaのPDZ14タンパク質の分解産物も検出された。

【図 15】

クロンテック社のプロテインメドレイのうち、ヒト性巣 (Testis: T), 骨格筋 (Skeletal Muscle: Sk), 肝臓 (Liver: Lv), 心臓 (Heart: H), 脳 (Brain: B) の各組織の細胞破碎液100ugをブロットしたフィルターをペプチド32-8-1-17、PDZ14、PDZ56を免疫したウサギの抗血清によりウエスタンブロッティングした。5000倍に希釈したウサギ抗血清、1000倍に希釈したビオチン標識の抗ウサギIgを抗体、2500倍に希釈したHRP (ホースラディッシュペルオキシダーゼ) 標識のストレプトアビジン-ビオチン複合体 (アマシャム社) の順に反応させ、化学発光によるウサギ抗血清と反応するタンパク質のバンドを検出した結果を示す。肝臓組織において130Kda付近に32-8-1タンパク質由来と思われるバンドを検出した。

図面

```

848 FISLLKTAQMTVKLTIHAENPDSDQAVPSAAGKKNSSQSLMVPQSG 897
||||||| ||| : ||| |||. |||:|. ||. ||
2 FISLLKTAQATVKLIVRAENPACPAVPSSAVTVSGERKDNSQTPAVP... 48

998 SPEPESIRNTSRSTPAIFASDPATCPIIPGCETTIEISKGRGTGLGLSIV 947
.: | | .||||||:||||||| :|||.|||||||
49 APDLEPIPSTSRSTPAVFAVDPATCPIIPGCETTIGVSKGQTGLGLSIV 98

948 GGSDTLLGAFIIEVYEEGAACKDGR LWAGDQILEVNGIDLKATHDEAI 997
||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| |||||||||
99 GGSDTLLGAFIIEVYEEGAACKDGR LWAGDQILEVNGIDLKATHDEAI 148

998 NVLRQTPQVRVRLTYRDEAPYKEEEVCDTLTIE..LQKPKGKGLGLSIVG 1045
|||||||.|||||||:|||| ||| :|:|||||||
149 NVLRQTPQVRVRLTYRDEAPYKEEDVCDTFTIELQLQKRPKGKGLGLSIVG 198

046 KRNDTGVFVSDIVKGGIADPDGR LIQGDQILLVNGEDVRNASEEVAALL 1095
||||||| |||||.|||||:|||||.|.|||||
199 KRNDTGVFVSDIVKGGIADADGR LMGGDQILMVNGEDVRHATQEEVAALL 248

096 KCSLGTVTLEVGR IKA6PFHSERRPSQTSQVSEGLSSFTFPLSGSSTSE 1145
|||| |||||:| |||||||.|||| ||||| ||| .||
249 KCSLGAVTLEVGRVKAAPFHSERRPSQSSQVSESLSSFTFPLSGINTSE 298

146 SLESSSKKNALASEIQGLRTVEMKKGPTDSLGISIAGGVGSP LGDVPIFI 1195
|||.||||||| |||||.||| |||:|||||||
299 SLESNSKKNALASEIQRLRTVEIKKGPADSLGLSIAGGVGSP LGDVPIFI 348

196 AMMHPTGVAAQTQKL RVGDRIVTICGTSTEGMTHTQAVNLLKNASGSIEM 1245
|||| |||||||||:|||||||:|||||||.
349 AMMHPNGVAAQTQKL RVGDRIVTICGTSTDEMTHTQAVNLMKNASGSIEV 398

246 QVVAGGDVSVVTGHHQEPASSLSFTGLTSTSI FQDDLGP PQCKSITLER 1295
||||||| |||. |.|||||.|| |||||.|||:|
399 QVVAGGDVSVVTGHHQELANPCLAF TGLTSSIFPDDLGP PQSKTITLDR 448

296 GPDGLGFSIVGGYGSPHGDLPIYKTVFAKGAASEDGR LKRGDQIIAVNG 1345
||||||| ||||||||| ||||||||| |||||||||
449 GPDGLGFSIVGGYGSPHGDLPIYKTVFAKGA AEDGR LKRGDQIIAVNG 498

346 QSLEGVTHEEAVAILKRTKGTVTLMVLS 1373
|||||||
499 QSLEGVTHEEAVAILKRTKGTVTLMVLS 526

```

【図 2】

```

921 ATCP IIPGCETTIEISKGR TGLGLSIVGGS DTL LGAFI IHEVYEEGAACK 970
|||||
1 ATCP IIPGCETTIEISKGR TGLGLSIVGGS DTL LGAFI IHEVYEEGAACK 50

971 DGR LWAGDQ ILEVNGIDLRKATHDEA INVL RQTPQRVRL TLYRDEAPYKE 1020
|||||
51 DGR LWAGDQ ILEVNGIDLRKATHDEA INVL RQTPQRVRL TLYRDEAPYKE 100

1021 EEVCDTLT IELQKKPGKGLGLSIVGKRNDTGVFVSDIVKGGIADPDGR LI 1070
|||||
101 EEVCDTLT IELQKKPGKGLGLSIVGKRNDTGVFVSDIVKGGIADADGR LM 150

1071 QGDQ ILLVNGEDVRNASQEA VAALLKCSLGT VTLLEVGR IAGPFHSERRP 1120
|||||
151 QGDQ ILMVNGEDVRNATQEA VAALLKCSLGT VTLLEVGR IAGPFHSERRP 200

1121 SQT SQVSEGLSSFTFPLSGSSTSESLESSSKKNALASEIQGLRTVEMKK 1170
|||||
201 SQT SQVSEGLSSFTFPLSGSSTSESLESSSKKNALASEIQGLRTVEMKK 250

1171 GPTDSLGI SIAGGVGSPLGDVPIFIAMHPTGVAAQTQKL RVGDRIVTIC 1220
|||||
251 GPTDSLGI SIAGGVGSPLGDVPIFIAMHPTGVAAQTQKL RVGDRIVTIC 300

1221 GTSTEGMTH TQAVNLLKNASGSIEMQV VAGGDVSVVTGH HQEPASSLSF 1270
|||||
301 GTSTEGMTH TQAVNLLKNASGSIEMQV VAGGDVSVVTGH HQEPASSLSF 350

1271 TGLTSTSIFQDDLGP PQKSITLERGPDGLGFSIVGGYGS PHGDLPIYVK 1320
|||||
351 TGLTSSSIFQDDLGP PQKSITLERGPDGLGFSIVGGYGS PHGDLPIYVK 400

1321 TVFAKGAASEDGR LKRGDQIIAVNGQSLEGVTHEEAVAILKRTKGTVTLM 1370
|||||
401 TVFAKGAASEDGR LKRGDQIIAVNGQSLEGVTHEEAVAILKRTKGTVTLM 450

1371 VLS 1373
|||
451 VLS 453

```

【図 3】

1	WCCRRTPPTTQSELDLDCDIELTEKPHVDLGEFISSETEDPVLAM	50	401	GLGIVRSIHHGGAISRDGRIAGDCILSINEESTISVTNAQARAWLRH	450
620	WCCRRTPPTALSEVDSLDIHDLELTKPHDLGEFISSETEDPVLAM	669	1015	GLGIVRSIHHGGAISRDGRIAGDCILSINEESTISVTNAQARAWLRH	1064
51	TDAGQSTEEVQAPLAMEAGIQHIELEKSGKLGFSILDYQDPIDPASTV	100	451	SLIGPDIKITVYPAEHLEEFKISLGGQSGRVMALDIFSSYTGDIPELPE	500
670	SDVDQNAEEIQTPLAMEAGIQHIELEKSGKLGFSILDYQDPIDPANTV	719	1065	SLIGPDIKITVYPAEHLEEFKISLGGQSGRVMALDIFSSYTGDIPELPE	1114
101	IIIRSLVPGGIAEKDGRLLPGDRMFVNDVNLNSSLLEAVEALKGAPSG	150	501	REEGESEELQNTAYSNNQPRRVELWRPEPSKSLGTSIVGGRGMSRLS	550
720	IVIRSLVPGGIAEKDGRLLPGDRMFVNDVNLNSSLLEAVEALKGAPSG	769	1115	REEGESEELQNAAYSSWQPRRVELWRPEPSKSLGTSIVGGRGMSRLS	1164
151	TVRIGVAKPLPSPEEGYVSAKEDFLYPHSCCEAGLADKPLFRADLAL	200	551	NGEWMRGIFIKHVLDSAPKNGTLKPGDRIVE.....	583
770	WVRIGVAKPLPSPEEGYVSAKEDFLCSPHTCKEMGLSDKALFRADLAL	819	1165	NGEWMRGIFIKHVLDSAPKNGTLKPGDRIVEVGDQDLRDASHEQAVEA	1214
201	VGTNDADLVDESTFESPSPENDSYSTQASLSLHGSGDGLNYGSSL	250	584	...APSQSESEPEKAPLCSVPPPPPSAFENGSDHTQSSASKISQDVQKE	630
820	TDTPDAESVAESRFESQFSPDNDVSYSTQASVLSLHDGACSDGMVYGFSL	869	1265	SDKAPSQSESESEKATLCSVPSSPSVFESESSDYAQPSSATTVAEDNE	1314
251	PSSPPKDVIENTSCDPVLDLHMSLEELYTONLLERQDENTPSVDISKGPAS	300	631	DEFGYSWKNIERYGTLTGELHMTLEKKGHSLGLSLAGNKORSRHSVFI	680
870	PSSPPKDV.THSSDLVLGLHLGLEELYTONLLERQDENTPSVDISKGPAS	918	1315	DEFGYSWKNIERYGTLTGELHMTLEKKGHSLGLSLAGNKORSRHSVFI	1364
301	GFTINDYTPANAIEQQYECENTWTFESHLPSEVISSAELPSVLPDSAGK	350	681	VGIDPNGAAGKGRQLQIADELLENGQILYGRSHQMASSIIKCAPSKVKI	730
919	GFTVSDYTPANAIEQQYECANTVANTPSQLPSG.LSTTELAPALPAVAPK	967	1365	VGIDPNGAAGKGRQLQIADELLENGQILYGRSHQMASSIIKCAPSKVKI	1414
351	GSEHLLQSSLACNAECVMLQNVSKESFERTINIAKGNSSLGHTVSAWKD	400	731	IFIRNKQAVNQAVCPGNAVEPLPSNSENLOKWKETEPTVTTSDAVIDLSS	780
968	...YLTEQSSLVSDAESVTLQSMQAEFERTVTIAKGNSSLGHTVSAWKD	1014	1415	IFIRNKQAVNQAVCPGNAVEPLPSNSENLOKWKETEPTVTTSDAVIDLSS	1464

【図 4】

781 FKNVQHLELPKQDGGGLGIAISEEDTLGVTINKSLTEHGVAATDGRLLVGD 830
 1465 LTNVYHLELPKQDGGGLGIAICEEDTLNGVTINKSLTERGGAQDGRLLRPGD 1514

831 QILAVODEIWGYPYIEKFISLKTAKMTVKLTTHAENPDSOAVPSAAGAA 880
 1515 RILAVODELVAGOPYIEKFISLKTAKMTVKLTGVAENPGCOAVPSAAVTA 1564

881 SGEKKNSSQLMWPGSGSPESIRNTSRSSPTAIFASDPATCPIIPGCE 930
 1565 SGERKSSQTPAVP...APDLEPTPSTSRSSPTAIFASDPATCPIIPGCE 1611

931 TTIEISKGRITGLSIVGGSOTLLGAFTHIHEVYEEGAACKDGRLLWAGDQI 980
 1612 TTIEISKGRITGLSIVGGSOTLLGAFTHIHEVYEEGAACKDGRLLWAGDQI 1661

981 LEVNGIDLKATHDEAINVLKQTPQVRVRLTYRDEAPYKEEVCOTLTIE 1030
 1662 LEVNGIDLKATHDEAINVLKQTPQVRVRLTYRDEAPYKEEVCOTLTIE 1711

1031 LQKRPCKGLGLSIVGKRNDTGVSIVKGGIADPDGRLIQGDQILLVNG 1080
 1712 LQKRPCKGLGLSIVGKRNDTGVSIVKGGIADPDGRLMQGDQILLVNG 1761

1081 EDVRNASQEAVALKCSLGTVTLEVGRITKAGPFHSERRPSQTSQVSEGS 1130
 1762 EDVRNATQEAVALKCSLGTVTLEVGRITKAGPFHSERRPSQTSQVSEGS 1811

1131 LSSFTFPLSGSSTSESLESSKKNALASEIQGLRTVEMKGPOTSLGSI 1180
 1812 LSSFSLPRSGIHTSESSESSAKKNALASEIQGLRTVEIKGPADALGSI 1861

1181 AGGVGSPGLDVPYIFIANHPTGVAQTKLRVGDRIVTICGTSTEGWTHT 1230
 1862 AGGVGSPGLDVPYIFIANHPTGVAQTKLRVGDRIVTICGTSTEGWTHT 1911

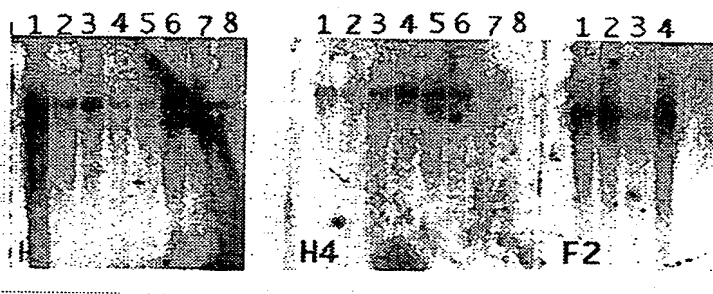
1231 QAVILLKNASGSIENQWAGDYSVVTGHHQEPASSLSFTGLTSTSIQ 1280
 1912 QAVILLKNASGSIENQWAGDYSVVTGHHQEPASSLSFTGLTSTSIQ 1961

1281 DDLGPPQCKSTTLERPGDGLGFSIVGGYSGPHGDLPIYVKTVFAKGAASE 1330
 1962 DDLGPPQCKSTTLERPGDGLGFSIVGGYSGPHGDLPIYVKTVFAKGAASE 2011

1331 DGRLLKRGDQIIAVNGOSLEGVTHEEAVAILKRTKGTVTLMWLS 1373
 2012 DGRLLKRGDQIIAVNGOSLEGVTHEEAVAILKRTKGTVTLMWLS 2054

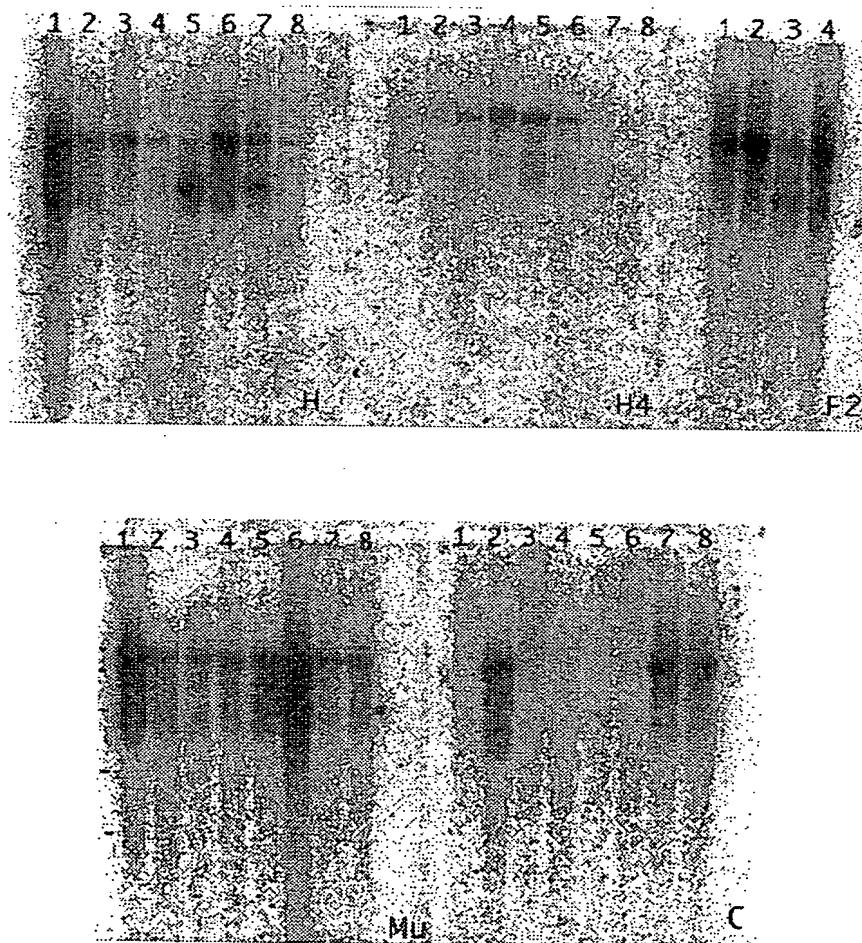
【図5】

図面代用写真

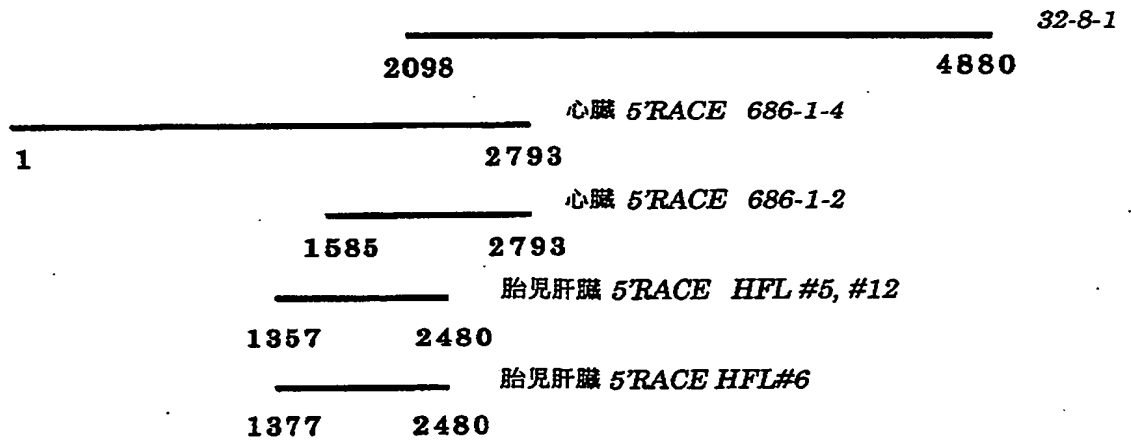
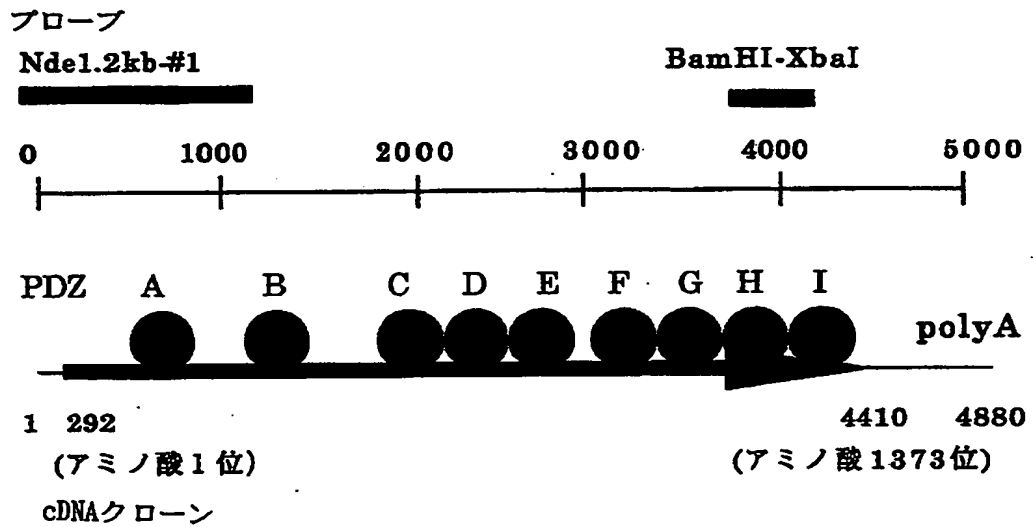


【図6】

図面代用写真



【図 7】

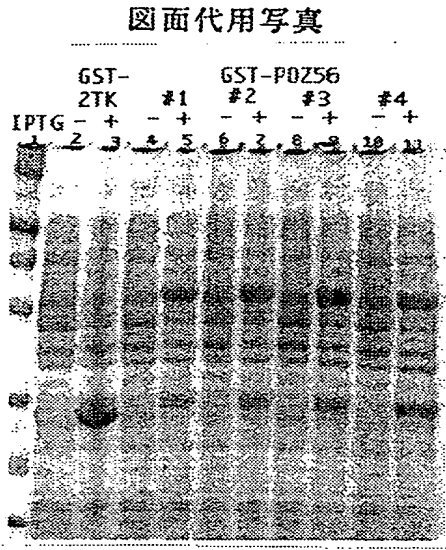


【図 8】

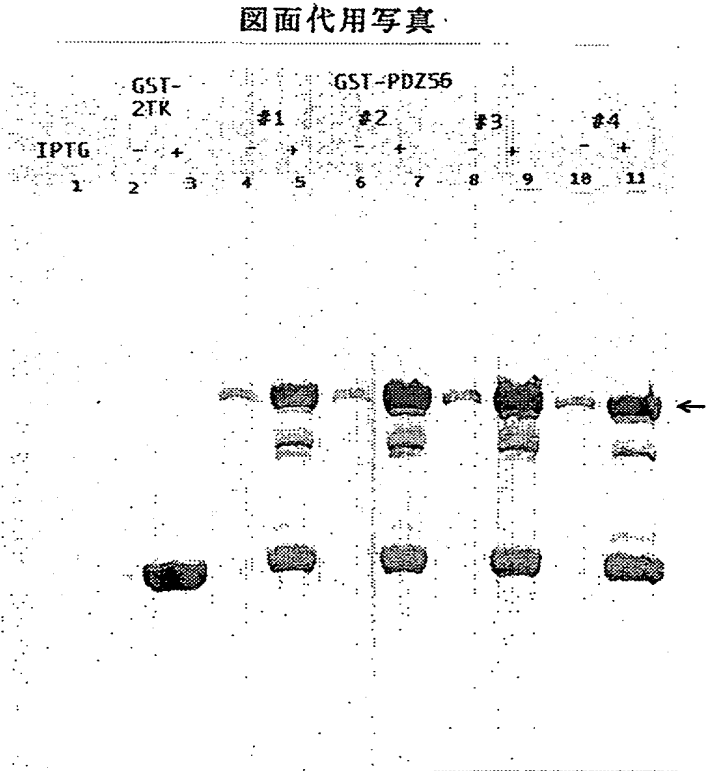
	1				50
PDZ-A	AGIQHIELE.	KGSKGLGFSI	LDYQD.....	PIDPASTVII	IRSLVPGGIA
PDZ-B	QNVSKESFER	TINIAKGNSS	LGMTV.....	SANKDGLGMI	VRSIHGGAI
PDZ-C	NQPRRVELWR	EPSKSLGISI	VGGRGMGSRL	SNGEVMRGIF	IKHVLEDSPA
PDZ-D	GELHMIELEK	GHS.GLGLSL	AGNKD.....	RSR.M..SVF	IVGIDPNGAA
PDZ-E	KNVQHLELPK	DQG.GLGIAI	SEEDTLSGVI	IKSLTEHGVA
PDZ-F	GCETTIEISK	GRT.GLGLSI	VGGSD.....	TLL.G..AFI	IHEVYEEGAA
PDZ-G	CDTLTIELQK	KPGKGLGLSI	VGKRN.....DTGVF	VSDIVKGGIA
PDZ-H	QGLRTVEMKK	GPTDSLGISI	AGGVG.....	SPL.GDVPIF	IAMMHPTGVA
PDZ-I	PQCKSITLER	GP.DGLGFSI	VGGYG.....	SPH.GDLPY	VKTVFAKGAA

	51				96
PDZ-A	EKDGRLLPGD	RLMFVNDVNL	ENSSLEEAVE	ALKGAPSGTV	RIGVAK
PDZ-B	SRDGRIAIGD	CILSINEEST	ISVTNAQARA	MLRRHSLIGP	DIKITY
PDZ-C	GKNGTLPKGD	RIVEAPSQSE	SEPEKAPLCS	VPPPPPSAFA	EMGSDH
PDZ-D	GKDGRLQIAD	ELLEINGQIL	YGRSHQNASS	IIKCAP.SKV	KIIFIR
PDZ-E	ATDGRCLKVD	QILAVDDEIV	VGYPKEKFIS	LLKTAKM.TV	KLTIHA
PDZ-F	CKDGRWLWGD	QILEVNGIDL	RKATHDEAIN	VLRQTP.QRV	RLTLR
PDZ-G	DPDGRLIQGD	QILLVNGEDV	RNAS.QEAVA	ALLKCSLGTV	TLEVGR
PDZ-H	AQTQKLKRGD	RIVTICGTST	EGMTHTQAVN	LLKNAS.GSI	EMQVVA
PDZ-I	SEDGRCLKRGD	QIIAVNGQSL	EGVTHEEAVA	ILKRTK.GTV	TLMVLS

【図 9】

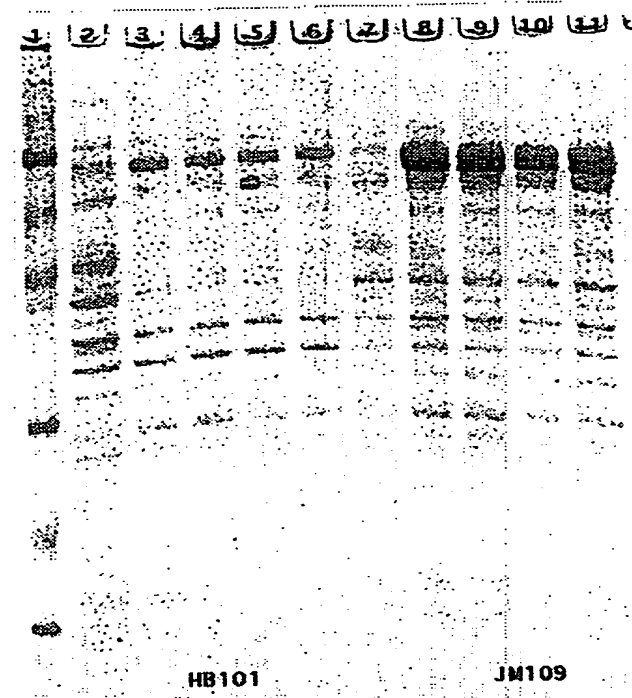


【図 10】



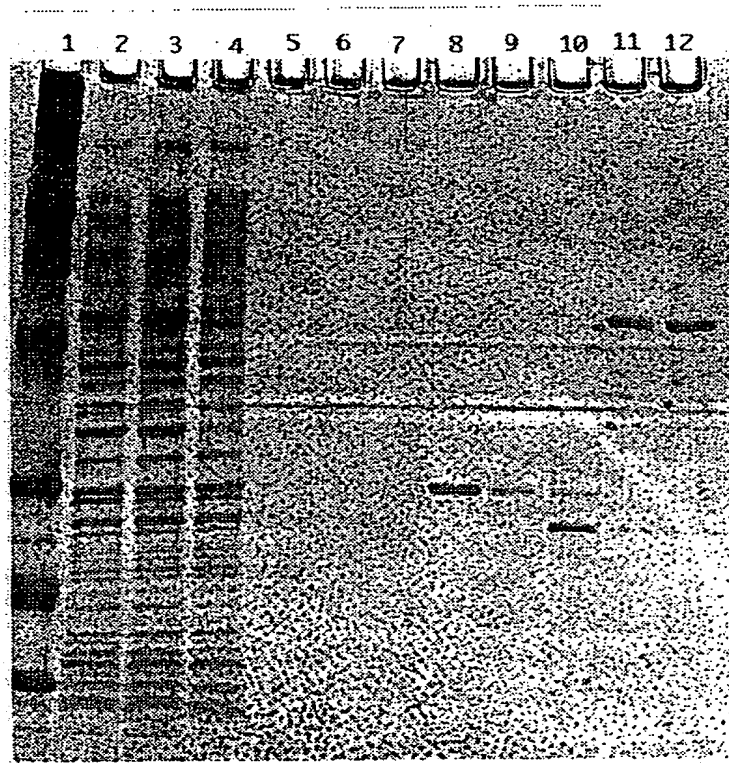
【図 1 1】

写真用代面図



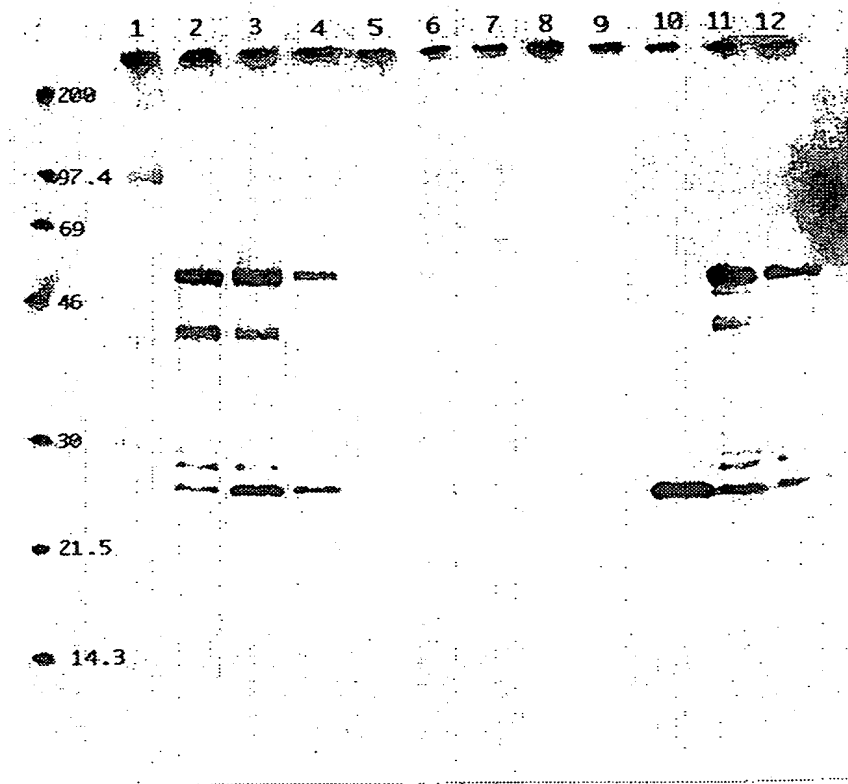
【図 12】

図面代用写真



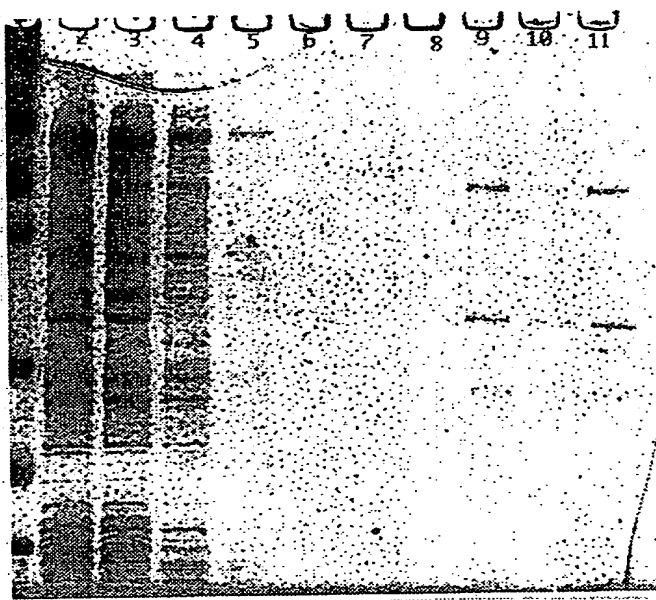
【図13】

図面代用写真



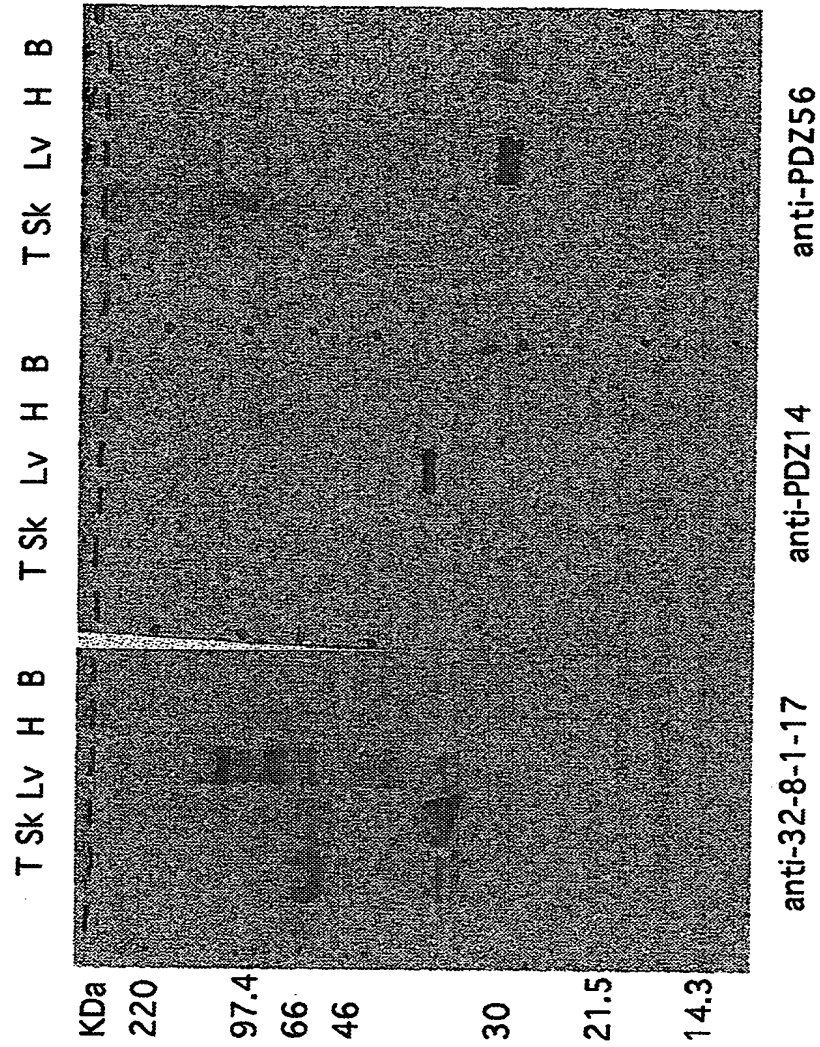
【図 14】

図面代用写真



【図 15】

図面代用写真



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 PDZドメインを有する新規なタンパク質、および該タンパク質をコードするDNAを提供することを課題とする。

【解決手段】 ヒト臍帯血管内皮細胞のTNF α による遺伝子発現の変化を解析していく過程において、TNFアルファの刺激により発現が上昇した遺伝子を単離し、該遺伝子をプローブとしてスクリーニングを行ったところ、新規なタンパク質をコードする遺伝子を単離するに至った。単離した遺伝子がコードするタンパク質につき解析を行ったところ、該タンパク質はこれまで報告のない新規なタンパク質であり、その分子内にタンパク質-タンパク質相互作用に重要な役割を果たしているPDZドメインを有していることを見出した。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 596102791
【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2
【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所

【代理人】 申請人

【識別番号】 100102978
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階
清水国際特許事務所
【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階
清水国際特許事務所
【氏名又は名称】 橋本 一憲

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [596102791]

1. 変更年月日 1996年 7月15日

[変更理由] 新規登録

住 所 茨城県新治郡新治村永井153番地2

氏 名 株式会社中外分子医学研究所